

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

DEMONSTRATION, PAR L'ÉPREUVE DES BACTÉRIOPHAGES Vi, D'UNE ANALOGIE PHYSIOLOGIQUE ENTRE LES ANTIGÈNES Vi PRÉSENTS CHEZ DES ESPÈCES BACTÉRIENNES DIFFÉRENTES

par PIERRE NICOLLE, Géo RITA et MAURICE HUET (*).

(*Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

L'antigène Vi n'est pas l'apanage exclusif du bacille typhique. Il a été retrouvé chez d'autres germes appartenant aux *Salmonella* ou à des genres voisins (1).

Le but du présent travail a été de chercher si ces bactéries, n'ayant guère avec *S. typhi* en commun que ce facteur, étaient sensibles aux mêmes bactériophages Vi que celui-ci.

a) CULTURES ET BACTÉRIOPHAGES (2). — Nous avons utilisé les cultures types de Craigie et Felix (*S. typhi*), les cultures standard

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 7 juin 1951.

(1) A. Jude a publié récemment une monographie documentée sur l'antigène Vi [4].

(2) Nous remercions le Dr Buttiaux, de Lille, le Dr Desranleau, de Montréal, le Dr Felix, de Londres, le Dr Kauffmann, de Copenhague et le Dr Le Minor, de Paris, de nous avoir obligeamment donné les souches et les phages énumérés ci-dessous.

internationales de Kauffmann (*S. paratyphi* C « East Africa », *S. coli* 1 n^{os} 2624/36 et 5396/38 et deux cultures de *S. ballerup*), ainsi que de nombreuses cultures des mêmes espèces reçues par le Centre de Lysotypie de l'Institut Pasteur (Service du Bactériophage).

Les phages typiques Vi que nous avons employés proviennent du Central Enteric Reference Laboratory and Bureau, de Londres (D^r Felix) et du Laboratoire du Ministère de la Santé, de Montréal (D^r Desranleau). Ils comprennent les 24 préparations du phage II de Craigie, adaptées aux différents types de *S. typhi*, les phages I, II, III et IV de Craigie, les phages CV et EV de Desranleau.

Tous ces phages ont été utilisés, soit à leur concentration d'envoi, soit aux dilutions critiques pour la lysotypie, soit non dilués, après régénération sur une souche type A de *S. typhi*.

Le phage d_6 a été isolé et identifié comme phage Vi par Jude et l'un de nous (Jude et Nicolle, 1951 [2]).

Le phage CNV, qui agit sur la forme non Vi de *S. coli* 1 et laisse inattaquée la forme Vi, a été isolé d'un mélange commercial destiné à la phagothérapie.

Les autres phages proviennent de la collection du Service du Bactériophage de l'Institut Pasteur.

b) MILIEU DE CULTURE. — Le seul milieu utilisé, tant pour l'épreuve d'activité des phages que pour leurs titrages, a été la gélose peptonée (gélose, 1,5 g p. 100 ; peptone Uclaf, 3 g p. 100 ; ClNa, 0,5 g p. 100 ; pH = 7,4-7,6).

c) MÉTHODES. — Les essais d'activité des phages ont été effectués en déposant des gouttes de lysats purs ou dilués sur une plaque de géloseensemencée au préalable avec une culture de vingt-quatre heures en eau peptonée du germe à étudier. La lecture est pratiquée, après dix-huit heures d'étuve, à l'éclairage oblique.

La fixation des phages a été faite suivant la méthode décrite par Scholtens, 1937 [3], après un contact d'une heure à 37° C ou de vingt-quatre heures à + 4° C des phages avec les bactéries. Les germes avaient été préalablement tués par le formol ou par la chaleur.

Les titrages des phages ont été opérés par la technique « à la goutte » dans laquelle 1 goutte de chaque dilution de 10^{-1} à 10^{-7} est déposée sans étalement à la surface d'une plaque de gélose préalablementensemencée avec le germe sensible.

Les régénérations des phages Vi ont été faites en bouillon digestion au bain-marie à agitation mécanique, à 37° C, en utilisant exclusivement la souche de *S. typhi* type A de Craigie et Felix.

TECHNIQUE SPÉCIALE DU « PHAGE RÉVÉLATEUR DES ACTIONS LYTQUES MASQUÉES ». — Les phages typhiques Vi agissent, on le sait, exclusivement sur la forme Vi de *S. typhi*.

Les phages non Vi, d'ordinaire, lysent à la fois la forme Vi et la forme non Vi.

Le phage non Vi CNV, qui est actif sur un certain nombre d'espèces du groupe *coli*-typhique-paratyphique dépourvues d'antigène Vi, possède la curieuse propriété de lyser les variantes non Vi des deux souches de *S. coli* 1 n^{os} 2624 et 5396 de Kauffmann et de respecter la variante Vi. C'est donc pour cette espèce un phage strictement non Vi.

Pour l'utiliser comme « phage révélateur » des actions lytiques masquées produites par les phages Vi sur les cultures Vi \pm de *S. coli* 1, on pratique la technique suivante :

La culture à examiner estensemencée par étalement sur la surface entière d'une plaque de gélose. Sur une moitié de la surface, on étale le phage CNV (II gouttes de lysat pur). Puis on dépose symétriquement les gouttes des phages Vi sur l'une et l'autre moitié de la surface de gélose. Après dix-huit heures d'étuve, la boîte est examinée. Sur la surface non traitée par le phage CNV, on constatera, sur l'emplacement des gouttes des phages Vi, une lyse d'autant plus masquée que la proportion en germes Vi de la cultureensemencée était plus faible.

Sur la moitié qui a été traitée par le phage CNV, au contraire, les phages Vi produiront, même lorsque la proportion en éléments Vi de la culture a été très faible, une lyse totale ou presque totale.

L'action du phage CNV est facile à comprendre. Il fait disparaître du gazon bactérien la presque totalité des germes non Vi. Dès lors, les phages Vi ne laisseront rien subsister sur la gélose, à l'exception parfois de quelques rares colonies résistantes Vi et non Vi.

La technique décrite ci-dessus ne peut être utilisée pour les autres espèces à antigène Vi : le phage CNV est sans action sur les deux formes Vi et non Vi de *S. typhi*, de *S. paratyphi* C et de *S. ballerup*.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

a) EXPÉRIENCES DE FIXATION DES PHAGES VI PAR LES CULTURES DE *S. paratyphi* C ET DE *S. Ballerup*. — Nous avons confirmé entièrement les résultats de Scholtens sur l'aptitude de *S. paratyphi* C et de *S. ballerup* dans leurs formes Vi + et Vi \pm à fixer les phages Vi (phages I, II et IV non adaptés et préparation du phage II adaptée au type K de *S. typhi*).

Les formes Vi négatives de ces deux bacilles, c'est-à-dire non

TABLEAU I. — Action des phages typiques Vi sur diverses espèces possédant un antigène Vi serologiquement identique à celui de *S. typhi*.

| ESPÈCE | N° | PROVENANCE | TYPE ou forme | PHAGES Vi DE CROISSANCE régénérés sur <i>S. typhi</i> , type A | | | | PHAGES Vi Desranleau régénérés sur <i>S. typhi</i> , type A | | PHASE non Vi CNY 10 ¹⁰ |
|------------------------------|--|--|------------------------------|---|------------------------|--------------------------|-----------------------|--|-----------------------|---|
| | | | | I 2,4 10 ⁹ | II 10 ¹⁰ | III 8,10 ⁸ | IV 10 ⁸ | CV 10 ⁹ | EV 10 ⁹ | |
| <i>S. paratyphi</i> C. . . | East Af. 202 Vinz. 22 | Kauffmann. Le Havre. | Vi + Vi + Vi - | LC LC — | lcV — — | lcV — — | lcV — — | — — — | — — — | — — — |
| <i>S. ballertup.</i> | 1 1 2 | Le Minor. Variante W. Bultaux. Variante W. | Vi + Vi - Vi + Vi - | lcV — lcV — | lcV — lcV — | lcV — lcV — | lcV — lcV — | lcV — lcV — | — — — — | — — — — |
| <i>S. coli</i> 1 | 2624/36 2624/36 3396/38 3396/38 | Kauffmann Variante W. Kaufmann. Variante W. | Vi + Vi - Vi + Vi - | lcV — lcV — | lcV — lcV — | lcV — lcV — | lcV — lcV — | lcV — lcV — | — — — — | lcV LC lcV LC |
| <i>S. typhi</i> | Type A | Felix. Variante VW. Variante W. | Vi + Vi ± Vi - | LC lcV — | LC lcV — | LC lcV — | LC lcV — | LC lcV — | LC lcV — | LC LC LC LC |

LC, lyse confluyente; lcV, lyse confluyente partiellement masquée (voilée) par une culture secondaire continue; + + +, nombreuses plages.

agglutinables par le sérum anti-Vi, ne fixent pas ces phages. Les diverses cultures de *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B et *E. coli*, ne sont jamais agglutinées par le sérum anti-Vi.

Une étude spéciale sur la fixation des phages Vi par les espèces à antigène Vi a été publiée ailleurs (Rita et Nicolle, 1951 [4]).

b) RÉSULTATS POSITIFS AVEC LES PHAGES NON DILUÉS. — Un premier essai négatif avait été fait avec les phages Vi dilués tels qu'ils sont utilisés pour la lysotypie de *S. typhi*.

Les résultats très nets des expériences de fixation nous ont incités à recommencer en utilisant les phages Vi I, II, III et IV de Craigie, les phages Vi CV et EV de Desranleau et le phage Vi d_6 régénérés sur *S. typhi* type A (tableau I) :

lorsqu'on utilise les phages Vi de titre élevé, ils agissent tous sur *S. typhi*, sur *S. ballerup* et sur *S. coli*. Sur *S. paratyphi* C, le phage I seul donne une lyse nette sur les deux souches Vi. Les phages II, III et IV forment une lyse très discrète, mais encore perceptible avec la souche « East Africa » Vi +. Ils semblent, au contraire, dépourvus d'action sur la souche 202 Vi +.

Les subcultures des colonies Vi de *S. typhi* et, à un degré moindre, celles de *S. paratyphi* C, montrent, sous l'action des phages Vi, même après de nombreux repiquages, une lyse totale, c'est-à-dire une lyse intéressant toute l'épaisseur du gazon bactérien, à l'exception de quelques éléments (mutants résistants) peu nombreux qui forment dans la zone lysée quelques colonies secondaires.

Comment expliquer dans le cas de *S. ballerup* et de *S. coli* la formation d'une lyse voilée, même avec les premières subcultures de colonies Vi, au lieu de la lyse totale que l'on observe avec *S. typhi*? Cela tient à ce que les germes en question se dissocient très rapidement à un taux élevé. En partant d'une colonie Vi, dès la première subculture, presque la moitié des éléments sont de forme Vi négative. La lyse produite par les phages Vi est déjà voilée par une culture non Vi légère, mais continue. Après 3 ou 4 repiquages, la proportion d'éléments Vi tombe à 10 p. 100 environ. Le voile qui masque la zone lysée s'épaissit (fig. 1).

L'action des phages Vi ne se distingue plus à l'éclairage frontal. Seul l'éclairage oblique (Nicolle, Jude et Le Minor, 1950 [5], en provoquant des différences d'irisation, permet encore de constater un effet lytique.

Les subcultures repiquées une dizaine de fois ne contiennent plus que 1 ou 2 p. 100 d'éléments Vi. Dès lors, rien n'est visible, même par l'artifice de la transillumination oblique.

Or, dans le cas de *S. coli* 1, ces actions lytiques masquées peuvent être « révélées » par l'utilisation d'un phage non Vi, le

phage CNV qui, étalé sur la gélose en même temps que la culture pauvre en éléments Vi, éliminera du gazon bactérien les germes non Vi et permettra aux phages Vi de produire une lyse totale ou subtotale [voir paragraphe « Matériel et Technique »] (tableau II) [fig. 2, 3 et 4].

Le phage non Vi CNV est donc un phage « révélateur » de

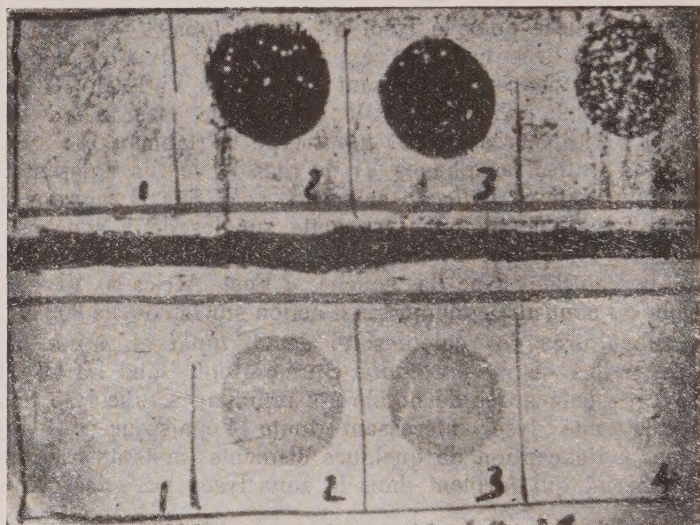


FIG. 1. — Rangée supérieure : ensemencement d'une plaque de gélose avec une suspension de bactéries provenant directement d'une colonie Vi de *S. bal-lerup*. On obtiendra ainsi, après dix-huit heures d'étuve, un gazon bactérien presque exclusivement composé de germes Vi.

En 1, 2, 3 et 4, on a déposé, avant la mise en étuve, respectivement 1 goutte du phage non Vi CNV et des phages Vi I, II et IV de Craigie.

Le phage non Vi CNV n'a produit aucune action. Les phages Vi ont donné une lyse confluyente presque totale puisque la culture est formée d'une forte majorité d'éléments Vi.

Rangée inférieure : même procédé, mais au lieu de partir directement d'une colonie Vi pour l'ensemencement, on utilise une culture repiquée plusieurs fois sur gélose. Une forte dissociation $Vi + \rightarrow Vi -$ s'est produite. Les phages Vi ne donnent plus qu'une lyse confluyente voilée. Le phage CNV (en 1) est encore sans action.

L'action des phages Vi, masquée par une culture non Vi trop abondante.

Il s'agit donc ici d'une synergie lytique de deux bactériophages, analogue à celle que nous avons décrite en 1944, concernant deux phages actifs respectivement sur la forme S et la forme R d'une culture SR de *S. paratyphi* B (Nicolle, 1944 [6]).

TABLEAU II. — Action des phages typhiques Vi sur diverses espèces possédant un antigène Vi sérologiquement identique à celui de *S. typhi*. Emploi d'un phage non Vi « révélateur », dans le cas de *S. coli* 1.

| ESPÈCE | N° | PROPORTION d'éléments Vi p. 100 | ÉTALONNEMENT sur gélose seule ou avec du phage CNV | PHAGE non Vi CNV 10 ¹⁰ | PHAGES Vi RÉGÉNÉRÉS SUR <i>S. typhi</i> TYPE A | | | | | | d ₅₀ 10 ³ |
|-------------------------------|-------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|--|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| | | | | | I 10 ⁹ | II 10 ¹⁰ | III 10 ⁸ | IV 10 ⁸ | CV 10 ⁹ | EV 10 ⁹ | |
| <i>S. coli</i> 1. | 2624 | 95 | Seule. | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 95 | + CNV | lcV | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 40 | Seule. | — | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | — |
| | | 40 | + CNV | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 3 | Seule. | — | ? | ? | ? | ? | ? | ? | — |
| | | 3 | + CNV | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 4 | Seule. | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>S. coli</i> 1. | 5396 | 1 | + CNV | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 400 | Seule. | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 400 | + CNV | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 5 | Seule. | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | — |
| | | 5 | + CNV | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| | | 4 | Seule. | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | | 4 | + CNV | — | LC | LC | LC | LC | LC | LC | — |
| <i>S. ballerup</i> | 1 | 400 | Seule. | — | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | — |
| | | 400 | + CNV | — | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | — |
| <i>S. typhi</i> | A | 400 | Seule. | LC | LC | LC | LC | LC | LC | LC | + |
| | | 400 | + CNV | LC | LC | LC | LC | LC | LC | LC | + |
| | | 40 | Seule. | LC | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | + |
| | | 40 | + CNV | LC | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | lcV | + |
| <i>S. paratyphi</i> C | East Africa | 95 | Seule. | — | lcV | lcV | lcV | lcV | — | — | — |
| | | 95 | + CNV | — | lcV | lcV | lcV | lcV | — | — | — |

FIG. 2, 3 et 4. — Démonstration du phage « révélateur » des lyses masquées produites par les phages Vi dans les cultures de *S. coli* 1.

Sur chaque plaque, on a ensemencé l'un des trois échantillons de la culture 2524/36 de *S. coli* 1 : 1° un échantillon Vi pur prélevé et étalé directement à partir d'une colonie Vi ; 2° un échantillon Vi

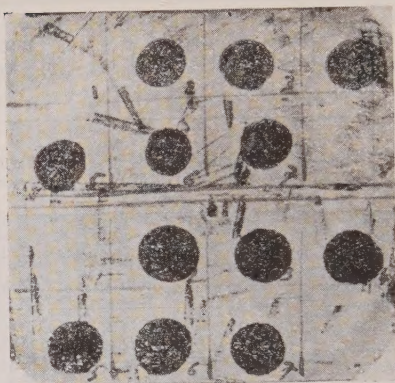


FIG. 2.

± obtenu en repiquant deux fois la culture n° 1 sur gélose inclinée ; 3° un échantillon très pauvre en éléments Vi, provenant de la même culture repiquée dix fois.

Après l'ensemencement, la partie inférieure de chaque boîte reçoit par étalement sur toute sa surface, le phage non Vi CNV.

Ensuite, on dépose au centre de

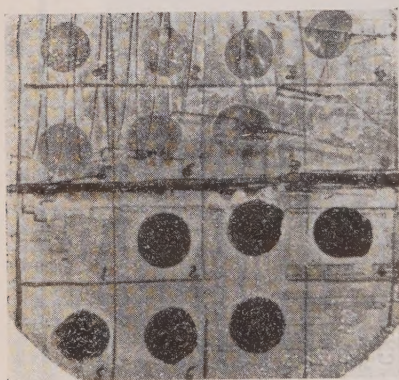


FIG. 3.

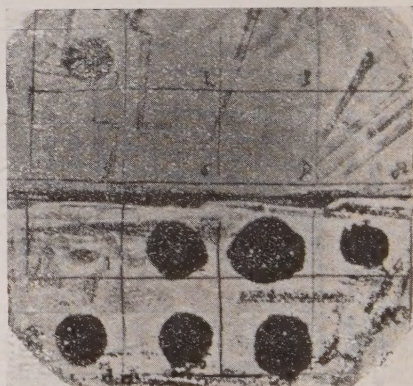


FIG. 4.

chaque case, le phage non Vi CNV et les phages Vi I, II, III, IV, CV, EV et d₆. La première culture, composée d'une forte majorité d'éléments Vi subira dans sa moitié supérieure la lyse confluyente presque totale avec tous les phages Vi (à l'exception du phage Vi d₆).

Sur la moitié inférieure, le traitement de la culture par le phage non Vi CNV a fait disparaître les quelques colonies secondaires non Vi qui s'étaient formées pour chaque phage Vi. Le phage non Vi CNV (case 1) ne montre aucune action visible en raison du trop petit nombre de germes non Vi.

La deuxième culture, en raison de la dissociation Vi + → Vi — déjà importante, donnera une lyse voilée avec les phages Vi et une lyse voilée également avec le phage non Vi. Mais dans la partie de la culture qui a été traitée par le phage non Vi CNV (moitié inférieure), les phages Vi ont produit la lyse à peu près totale, ce qui se comprend, puisque le traitement par le phage non Vi CNV, déposé en goutte (case 1), n'a manifesté aucun pouvoir lytique.

La troisième culture, contenant une très faible proportion d'éléments Vi (2 p. 100), montre très nettement comment l'action masquée des phages Vi dans la culture non traitée (moitié supérieure) peut être révélée par l'étalement du phage non Vi CNV (moitié inférieure). Le phage non Vi CNV (case 1) déposé en goutte agit fortement sur la culture non traitée en raison du nombre de germes non Vi et n'agit pas sur la culture traitée.

De très nombreuses cultures de *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B et d'*Escherichia coli* ont été éprouvées sans résultats par les phages Vi. Ces espèces, on le sait, ne sont jamais agglutinables par les sérums anti-Vi (3). Il est donc normal qu'elles n'aient montré aucune sensibilité aux phages Vi.

c) PREUVES DE L'ACTION BACTÉRIOPHAGIQUE. — 1° *Formation de plages*. — Pour écarter l'objection d'une action antibiotique,

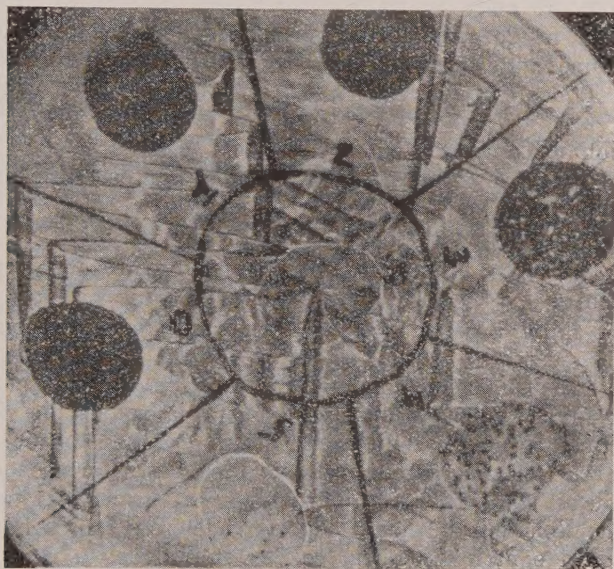


FIG. 5. — Titrage du phage Vi IV de Craigie sur *S. paratyphi* C. La plaque de gélose est ensemencée avec une culture de vingt-quatre heures, sur gélose, de *S. paratyphi* C, souche « East Africa » de Kauffmann. En 0, 1 goutte de phage pur est déposée. En 1, 2, 3, 4, 5 et 6, série décimale des dilutions de 10^{-1} à 10^6 .

Après vingt-quatre heures d'étuve, le phage pur et les deux premières dilutions ont donné une lyse confluyente. Les dilutions suivantes ont provoqué la formation de plages.

nous avons pratiqué des titrages des divers bactériophages Vi sur les différentes souches des espèces Vi et nous avons constaté

(3) On sait que pour Felix il existe un antigène Vi chez *S. paratyphi* B et de nombreuses autres *Salmonella*. La présence de cet antigène, d'après l'auteur, peut être mise en évidence par les réactions d'agglutination après absorption des agglutinines d'un antisérum sur les bacilles vivants, tués par la chaleur, ou traités par l'alcool et l'acide chlorhydrique. Chez les bacilles paratyphiques B, cet antigène est désigné sous le nom d'antigène B Vi.

que les dilutions appropriées de ces phages déterminaient la formation de plages très nettes.

2° *Régénération des phages Vi*. — D'autre part, nous avons régénéré les phages Vi sur les souches en question et nous avons obtenu régulièrement une lyse plus ou moins masquée, mais toujours visible, accompagnée d'une augmentation du titre des phages en question (fig. 5).

Exemple : Régénération du phage I sur *S. coli* I n° 2624.

Bouillon : 15 cm³.

S. coli I n° 2624 : 2×10^5 germes par centimètre cube provenant d'une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée.

Phage I de Craigie : $2,4 \times 10^5$ corpuscules par centimètre cube.

Agitation mécanique à 37° C.

Lyse partielle, mais appréciable en trois heures trente minutes.

Filtration sur bougie L₃.

Titrage du phage I du filtrat :

Sur *S. coli* : 4×10^7 corpuscules par centimètre cube (approximativement) ;

Sur *S. typhi* type A : $3,8 \times 10^8$ corpuscules par centimètre cube.

Chose curieuse, cette augmentation du titre était toujours plus nette lorsque le titrage était pratiqué sur la souche de *S. typhi* type A que sur la souche de *S. coli* n° 2624 qui avait servi à régénérer le phage. Il faut dire que les plages formées dans la culture de *S. typhi* sont toujours nettes et grandes, tandis que celles que l'on observe dans le gazon bactérien moins homogène de *S. coli* I sont très petites, voilées et difficiles à voir.

DISCUSSION.

Parmi les facteurs, probablement multiples, qui commandent la sensibilité des bactéries aux bactériophages homologues, les antigènes bactériens spécifiques jouent un rôle primordial (Hadley, 1925-1926 [7] ; Burnet, 1927-1929 [8, 9]) : un certain bactériophage, par exemple, d'après Burnet, agit sur des *Salmonella* qui possèdent l'antigène somatique IX : *S. typhi*, *S. pullorum*, *S. enteritidis* et laisse inattaquées celles qui en sont dépourvues, notamment : *S. paratyphi* A, *S. cholerae suis*.

L'antigène en question permet à ce bactériophage de se fixer sur la cellule. Il est le « récepteur bactérien du phage ».

Bien que la fixation ne soit pas nécessairement suivie du processus lytique complet, elle en est l'acte préliminaire obligatoire.

La spécificité d'action des bactériophages est donc liée, tout

au moins pour les *Salmonella*, les *Shigella* et quelques autres genres, à la constitution antigénique des bactéries que l'on soumet à leur action.

Un autre exemple, particulièrement frappant, de l'affinité spécifique de certains phages pour un antigène particulier a été donné en 1936, par Craigie et Brandon [40], Scholtens [41], Sertic et Boulgakov [42] : il existe des phages qui ne se fixent et ne provoquent la lyse que chez les bacilles typhiques qui élaborent l'antigène Vi. Les bacilles dépourvus de cet antigène, même ceux qui prennent naissance par dissociation dans une culture dont la forme Vi est sensible, résistent à ces phages.

Rappelons incidemment que le phage Vi II de Craigie et Yen, 1938 [43], est doué d'une remarquable mutabilité qui lui permet d'acquérir, par régénération sur une culture Vi donnée de *S. typhi*, un pouvoir lytique considérable, non seulement vis-à-vis de cette culture, mais aussi vis-à-vis de cultures analogues, c'est-à-dire du même « type ». En même temps, il perd la presque totalité de sa force pour les cultures des autres types. On sait l'ingénieux parti que ces auteurs ont tiré de cette propriété et les services que rendent à l'épidémiologie, ainsi qu'à la recherche théorique, la « lysotypie » (4) du bacille typhique par les phages « adaptés » dérivés du phage II (voir à ce sujet : Craigie et Felix, 1947 [44] ; Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950 [45]).

Il ne semble pas que les différences constatées entre les divers types de *S. typhi* dans leur sensibilité aux phages Vi correspondent à des modifications de la qualité de l'antigène Vi (Craigie, 1946 [46]).

« There is no known difference in the Vi antigens formed by the various phage types of *S. typhosa*. We may conclude, therefore, that all mutants of type II Vi phages must have, in the terminology of Burnet « the same B receptors ». It is obvious that the lytic specificity of the mutants of type II Vi phage depends not on specificity of adsorption but on some specific factor in the host cell which determine penetration and multiplication of the bacteriophage. »

Aucune méthode sérologique ou biochimique ne permet de déceler dans toute l'espèce la moindre hétérogénéité sous ce rapport.

En est-il de même pour les antigènes Vi rencontrés dans d'autres espèces ?

On sait que des antigènes sérologiquement comparables à l'anti-

(4) Le terme « lysotypie » a été proposé par Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950 [45], pour traduire l'expression anglaise « phage-typing », c'est-à-dire la détermination des « types » par les bactériophages.

gène Vi qui a été découvert par Felix et Pitt en 1934 [17, 18, 19] chez *S. typhi* ont été mis en évidence chez *S. paratyphi* C, par Kauffmann en 1935 [20], chez *S. ballerup*, par Kauffmann et Möller en 1940 [21], chez *S. coli* 1 par Kauffmann en 1941 [22, 23], chez *S. hormaechei* (Monteverde, 1944 [24] et Edwards, 1946 [25]). Les trois derniers germes ont été classés par Kauffmann parmi les *Salmonella* en raison de la présence chez eux d'antigènes habituellement rencontrés dans ce genre. *S. ballerup* et *S. hormaechei* sont considérées par d'autres auteurs, notamment par Bruner, Edwards et Hopson, 1949 [26], comme appartenant au groupe *Paracolobactrum* (5).

Le sérum de lapins ayant reçu une suspension d'une culture Vi de l'une des espèces énumérées plus haut contient des agglutinines actives sur les autres espèces dans leur forme Vi.

Pour Kauffmann et de nombreux autres auteurs, les antigènes Vi élaborés par ces différentes espèces sont identiques ou du moins très étroitement apparentés par leurs propriétés agglutinogènes.

Billaudelle, 1950 [27], cependant, se basant sur les types d'agglutination observés chez *S. typhi*, *S. paratyphi* C, *S. ballerup* et *S. coli*, admet des différences dans la qualité des antigènes Vi présents chez ces diverses espèces.

En attendant que ces faits soient confirmés, on pouvait se demander si le degré d'analogie entre les antigènes Vi élaborés par ces espèces variées était suffisant pour conférer à tous ces germes une sensibilité commune aux bactériophages Vi.

Kauffmann, 1935 [20], 1937 [28], avait signalé que certaines cultures de *S. paratyphi* C possédant l'antigène Vi étaient insensibles au phage Vi 162 de Sertic, mais que la souche East Africa de la même espèce, soumise à un phage Vi de Craigie, subissait un « léger éclaircissement » sur la nature exacte duquel il ne se prononçait pas.

Scholtens, 1937 [3], avait montré que les cultures Vi de *S. paratyphi* C tuées par la chaleur étaient capables de fixer les corpuscules du phage Vi Ty 1. Mais, d'après lui, cette capacité de fixation ne s'accompagnait pas d'une sensibilité des bacilles vivants :

« I examined a few of these strains (viz. East Africa, Wiltblood, Baghdad and arrived at the same conclusion as Kauffmann, 1936, viz. that these strains are insensitive to Vi bacteriophages both on solid and in fluid culture media. »

(5) Depuis la rédaction de ce travail, nous avons eu connaissance du livre de F. Kauffmann : *Enterobacteriaceae*, dans lequel l'auteur range *S. ballerup* dans le groupe indépendant « *Ballerup-Bethesda* » et *S. coli* dans le genre *Escherichia*.

Billaudelle, 1950 [27], a obtenu, au contraire, une action des phages Vi typiques en sa possession sur quelques cultures de *S. paratyphi* C, mais aucune action sur *S. ballerup* ni *S. coli* 1 (cultures 2624/36 et 5396/38 de Kauffmann, paracoli Vi Dezember, coli Vi 30 p Knöll).

Cependant, il signale que ces phages Vi (qui ne sont pas ceux de Craigie) agissent également sur des cultures de *S. paratyphi* A, de *S. paratyphi* B et de *S. enteritidis* (Gartner P₅).

Devant ces résultats, on est en droit de se demander si les phages dont l'auteur s'est servi sont vraiment des phages Vi. Pour notre part, nous n'avons jamais constaté de lyse bactériophagique avec les phages Vi de Craigie sur les nombreuses cultures de *S. paratyphi* B que nous avons examinées à ce sujet.

Buttiaux, 1951 [29], a constaté que *S. ballerup* était sensible aux phages Vi typiques. Il a même proposé l'emploi de cultures de cette espèce dans la recherche des phages Vi typiques dans les eaux, pour déceler la présence actuelle ou le passage récent du bacille typhique dans ces milieux naturels.

En résumé, les opinions antérieurement publiées sont assez divergentes.

Nos recherches nous ont donné les résultats suivants :

a) En faisant agir sur les cultures Vi + de *S. typhi*, de *S. paratyphi* C, de *S. ballerup* et de *S. coli* 1, les phages Vi de Craigie (I, II, III et IV) et ceux de Desranleau (CV et EV) à des concentrations élevées (10^8 à 10^{10} corpuscules par centimètre cube), nous avons constaté, aussi bien en milieu liquide que sur milieu solide, que toutes ces cultures étaient sensibles tantôt à l'un de ces phages, tantôt à plusieurs, tantôt à tous. Cette sensibilité se manifestait par :

1° Une lyse en placard, sur milieu solide, lorsque les phages sont employés purs ;

2° Des plages parfaitement visibles, quoique souvent très petites, avec les dilutions suffisamment étendues ;

3° Une lyse en milieu liquide, d'autant plus complète que la culture contenait, au départ, davantage d'éléments Vi ;

4° Une augmentation du titre en corpuscules par régénération sur les espèces en question.

Il n'y a donc pas seulement, entre les antigènes Vi des différentes espèces, une simple analogie sérologique. Il y a une complète analogie physiologique, puisque, par la présence de cet antigène, seul facteur commun entre elles, tout le processus bactériophagique, c'est-à-dire la fixation des corpuscules, leur pénétration, leur multiplication et la lyse de la cellule bactérienne s'accomplit.

b) Au contraire, lorsque l'antigène Vi fait défaut, toutes ces espèces résistent aux phages Vi, de même que sont réfractaires

les cultures des diverses espèces qui ne présentent jamais de variantes sérologiquement Vi positives : *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *Escherichia coli*, etc.

e) Les cultures qui contiennent à la fois des germes Vi et des germes non Vi (forme Vi \pm de Felix) subissent une lyse d'autant plus difficile à apprécier que la proportion des éléments Vi est plus faible. Sur milieu solide, il se produit une lyse « voilée », plus ou moins visible, qui peut devenir même une lyse entièrement masquée lorsque le pourcentage des éléments Vi tombe au-dessous de 1 ou 2.

d) Pour « révéler » ces lyses masquées, dans le cas de *S. coli* 1 seulement, on peut utiliser un phage non Vi, le phage CNV, qui, à l'inverse des phages Vi, n'agit que sur les éléments non Vi. Mélangé à la suspension bactérienne au moment de l'ensemencement, ce phage éliminera tous les éléments non Vi de la culture. Il se formera un gazon bactérien composé seulement d'éléments Vi, ce qui permettra aux phages Vi de donner une lyse confluyente totale au lieu d'une lyse masquée.

e) Inversement, par l'emploi d'un phage Vi en mélange avec la suspension bactérienne, on peut rendre totale la lyse d'une culture Vi \pm par le phage non Vi CNV.

f) Il convient de remarquer que le phage CNV, indépendamment de son activité spécifique pour la forme non Vi de *S. coli* 1, est dénué d'activité sur l'une et l'autre variante de *S. ballerup*. Ce dernier germe est classé aujourd'hui, nous l'avons vu, parmi les *paracolobactrum*. Sa résistance au phage CNV le distingue de *S. coli* 1.

L'existence d'un phage strictement non Vi est intéressante du point de vue théorique, même si l'activité de ce phage est limitée à l'espèce *S. coli* 1. En effet, on connaissait jusqu'à présent des phages actifs sur la forme non Vi, mais ces phages agissaient toujours, en outre, sur la forme Vi. Le phage CNV, rappelons-le, agit sur la forme non Vi de *S. coli* 1 et il respecte la forme Vi.

g) On possède donc, pour une même espèce dissociable en éléments Vi et en éléments non Vi, deux phages actifs, chacun, exclusivement sur l'une des variantes.

Pour le phage Vi, on comprend, d'après ce que nous savons, pourquoi il est actif sur la forme Vi ; il trouve chez celle-ci l'antigène qui lui est nécessaire pour s'unir à la bactérie.

Pour le phage non Vi, il paraît plus difficile d'admettre une relation entre la sensibilité et un antigène, présent dans la forme non Vi et absent dans la forme Vi. En effet, la variation Vi + \rightarrow Vi -, de toute évidence, ne s'accompagne pas d'un gain d'antigène, mais d'une perte.

Il faut donc supposer que c'est cette perte d'antigène qui a rendu la bactérie sensible au phage. L'antigène Vi protégerait

la cellule contre l'action du phage. Si cette action protectrice pouvait être prouvée — et on peut entrevoir plusieurs moyens de la prouver — il faudrait admettre que le même antigène, suivant le phage considéré, rend la même bactérie sensible à l'un et résistante à l'autre.

Une constatation analogue a été faite par Kauffmann et Vahlne, 1945, à propos des cultures d'*E. coli* riches en antigènes capsulaires A qui résistent aux phages actifs sur les cultures dépourvues de ces antigènes [30].

Il y a peut-être là un phénomène d'inhibition de la liaison phage — bactérie qui rappelle l'inhibition de l'agglutination « O » par la présence de l'antigène Vi en abondance dans les cultures de *S. typhi*. Le rôle inhibiteur d'un antigène, sur le pouvoir lytique d'un phage, révélerait un aspect nouveau de la relation entre la sensibilité des bactéries aux bactériophages et leur constitution antigénique.

RÉSUMÉ.

L'antigène Vi confère aux espèces *S. typhi*, *S. paratyphi* C, *S. ballerup* et *S. coli* 1 une sensibilité, générale ou partielle, aux bactériophages typhiques Vi. L'analogie sérologique des divers antigènes Vi se double donc d'une étroite analogie physiologique, puisque la présence de cet antigène, seul facteur commun entre des germes aussi différents, permet le développement du processus bactériophagique complet : la fixation des corpuscules, leur multiplication et la lyse de la cellule bactérienne.

Il existe, d'autre part, un bactériophage (phage non Vi CNV) qui, à l'inverse des phages Vi, n'agit que sur la forme Vi négative de *S. coli* 1. Ce bactériophage peut être utilisé comme « révélateur » des actions lytiques masquées produites par les phages Vi sur les cultures ne contenant qu'une proportion réduite d'éléments Vi. L'existence d'un tel phage pourrait bien révéler un nouvel aspect de la relation qui unit la constitution antigénique des bactéries à la sensibilité aux bactériophages.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. JUDE. *Biologie Méd.*, 1950, **39**, 1 à 34.
- [2] A. JUDE et P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1951 (sous presse).
- [3] R. TH. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1937, **37**, 315.
- [4] G. RITA et P. NICOLLE. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2268.
- [5] P. NICOLLE, A. JUDE et L. LE MINOR. *Ces Annales*, 1950, **78**, 572.
- [6] P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1944, **70**, 155.
- [7] P. HADLEY. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1925-1926, **23**, 443.
- [8] F. M. BURNET. *Brit. J. exp. Path.*, 1927, **8**, 121.
- [9] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 15.

- [10] J. CRAIGIE et K. F. BRANDON. *J. Path. a. Bact.*, 1936, **43**, 233.
- [11] R. TH. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1936, **36**, 452.
- [12] V. SERTIC et N. A. BOULGAKOV. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 35.
- [13] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canad. Publ. Health J.*, 1938, **29**, 448 et 484.
- [14] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **252**, 823.
- [15] P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 246.
- [16] J. CRAIGIE. *Bact. Rev.*, 1946, **10**, 73.
- [17] A. FELIX et R. M. PITT. *Brit. J. exp. Path.*, 1934, **15**, 346.
- [18] A. FELIX et R. M. PITT. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 409.
- [19] A. FELIX et R. M. PITT. *Lancet*, 1934, **2**, 186.
- [20] F. KAUFFMANN. *Zeitschr. Hyg. Infektionskr.*, 1935, **116**, 617.
- [21] F. KAUFFMANN et E. MÖLLER. *J. Hyg.*, 1940, **40**, 246.
- [22] F. KAUFFMANN. *Die Bakteriologie der Salmonellagruppe*. Einar Munksgaard. Copenhagen, 1941.
- [23] F. KAUFFMANN. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1941, **18**, 225.
- [24] J. J. MONTEVERDE. *Rev. Facultad Agron. Vet. Univ.*, Buenos-Aires, 1944, **2**, 4.
- [25] P. R. EDWARDS. *J. Bact.*, 1946, **51**, 523.
- [26] D. W. BRUNER, P. R. EDWARDS et A. S. HOPSON. *J. Infect. Dis.*, 1949, **85**, 290.
- [27] H. BILLAUDELLE. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1950, **108**, 119.
- [28] F. KAUFFMANN. *Zeitschr. Hyg.*, 1937, **119**, 103.
- [29] R. BUTTIAUX. *Analyse bactériologique des eaux de consommation*, 1951. Editions Médicales Flammarion, Paris (sous presse) et communication personnelle.
- [30] F. KAUFFMANN et G. VAHLNE. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1945, **22**, 119.

LES EXIGENCES EN CALCIUM DU PHAGE DE LISBONNE

par J. BEUMER et M.-P. BEUMER-JOCHMANS.

(*Institut Pasteur de Bruxelles.*)

Depuis qu'en 1925 Stassano et de Beaufort [1] observèrent que le citrate de soude empêchait la lyse du bacille de Shiga par un bactériophage, et que cette action inhibitrice du citrate pouvait être neutralisée par le chlorure de calcium, c'est un fait acquis que certains phages ne lysent qu'en présence de calcium, tandis que d'autres peuvent agir en l'absence de cet élément. Burnet et Mac Kie [2] ont fait de la sensibilité à l'action inhibitrice du citrate un des éléments de leur classification des phages coli-dysentériques.

J. Bordet [3] a reconnu en 1926 et confirmé avec E. Renaux [4] en 1928, que le phage que renferment les filtrats de cultures en bouillon du bacille coliforme lysogène de Lisbonne (phage L) ne lyse pas le bacille de Shiga en bouillon additionné de 1,5 p. 1 000 d'oxalate de soude. En bouillon suffisamment alcalin (rose à la phénolphtaléine) d'où le calcium a été presque complètement éliminé sous forme de précipité de phosphate tricalcique, le phage L ne lyse pas le bacille de Shiga ; l'addition de 0,02 p. 1 000 de chlorure calcique à ce bouillon permet au phage L d'y manifester son activité lytique. Ce phage exige donc des quantités notables de calcium, mais d'autres phages peuvent en exiger moins, ainsi que l'ont établi J. et P. Bordet [5] : le phage pfi qu'ils ont étudié lyse le coli ϕ S en bouillon oxalaté à 2 p. 1 000, mais ne le lyse pas en bouillon oxalaté à 5 p. 1 000; le phage PF, moins exigeant encore, lyse le coli ϕ R même en bouillon oxalaté à 5 p. 1 000. Il est probable, comme le pensent ces auteurs, que des phages différents peuvent exiger des quantités très variables de calcium. Signalons également que J. et P. Bordet [5 bis] ont reconnu que si l'addition d'oxalate de soude au milieu de culture empêche la régénération du phage L par la bactérie sensible, elle n'entrave pas sa formation par la bactérie lysogène. Les auteurs supposent que l'agression de la bactérie sensible exigerait la présence de calcium, sans que celui-ci soit nécessaire à la reproduction du phage.

Il est du plus haut intérêt, pour la compréhension de la lyse bactériophagique, de déterminer quelle est l'étape de ce phénomène qui exige la présence de calcium. Or, des recherches effec-

tuées par divers auteurs sur des phages différents, il paraît résulter que l'étape nécessitant la présence de calcium diffère selon le phage envisagé. C'est ainsi que Gratia [6] observe que pour certains phages le calcium est pratiquement indispensable à leur fixation sur les bactéries sensibles, et il attribue à l'absence de fixation en milieu sans calcium le fait que ces phages ne lysent pas en milieu oxalaté ou citraté. Th. F. Anderson [7] a montré que le *L*-tryptophane est indispensable à la fixation des phages T4 et T6 sur *E. coli* B. Or, Delbrück [8] a isolé un mutant du phage T4 dont la fixation sur la bactérie sensible exige, en plus du *L*-tryptophane, la présence d'ions Ca^{++} à la concentration de 4 à 10 μg par millilitre.

Certains phages ne se fixent donc pas sur les bactéries sensibles en absence de calcium ; d'autres phages, par contre, semblent se fixer normalement sur les bactéries en milieu privé de calcium, mais ne s'y multiplient pas. Un coliphage étudié par Andrewes et Elford [9] ne se multiplie pas et ne lyse pas les bactéries sensibles dans un milieu contenant 0,75 p. 100 de citrate de soude. Or, ce phage utilisé à forte concentration exerce sur les bactéries réceptives une action léthale, qui se manifeste même en milieu citraté. Les auteurs en concluent que le citrate ne gêne pas la pénétration du phage dans la bactérie, mais bien sa multiplication. Wahl [10] a montré qu'en milieu synthétique le phage C36 se fixe aussi bien sur le coli 36 en absence de calcium que lorsque le milieu en contient, mais que la multiplication de ce phage exige une concentration optimale de calcium de 0,08 g par litre. Adams [11] a établi que parmi les phages de la série T, l'un d'eux, T5, ne lyse pas en milieu synthétique sans calcium ; il lyse, par contre, si l'on ajoute à ce milieu du CaCl_2 à la concentration 0,001 M. Or, en l'absence de calcium, comme en milieu contenant cet élément, le phage T5 arrête la croissance des bactéries, mais alors qu'en présence de calcium le phage se multiplie et lyse les germes, en milieu sans calcium le phage ne se multiplie pas, mais au contraire diminue rapidement. Adams en conclut que la fixation du phage sur les bactéries sensibles ne requiert pas la présence de calcium, mais que ce dernier est nécessaire à la multiplication du phage fixé. Certains phages des streptocoques lactiques lysent parfaitement ces germes dans le lait, mais les lysent très mal en bouillon. D'après Shew [12], l'élément qui favorise la lyse dans le lait est le calcium, mais il n'est pas nécessaire à la fixation des phages sur les streptocoques sensibles.

Il résulte donc des travaux antérieurs que certains phages exigent, pour agir, des quantités plus ou moins grandes de calcium. Pour certains phages, le calcium est nécessaire à la fixation sur les bactéries sensibles, pour d'autres, dont la fixa-

tion s'effectue en l'absence de calcium, il est, par contre, indispensable à la multiplication.

Ainsi que nous l'avons rappelé en débutant, le phage produit dans les cultures en bouillon du bacille lysogène de Lisbonne (phage L) exige du calcium pour agir (J. Bordet [3]). Nous avons cherché à déterminer, pour ce phage, à quelle étape de la lyse le calcium était indispensable.

TECHNIQUE.

1° MILIEUX. — Les expériences ont été effectuées soit en bouillon nutritif, soit en milieu synthétique de J. Bordet (milieu B), dont voici la formule :

| | |
|--|-----------|
| PO_4HK_2 | 7 g |
| NO_3NH_4 | 1 g |
| SO_4Na_2 | 1 g |
| NaCl | 3 g |
| Asparagine | 2,5 g |
| Glycérine | 10 ml |
| Lactate d'ammonium | 2,5 g |
| Eau distillée | 1 l |
| pH | 7,4 à 7,6 |
| Stérilisation à 120° pendant 30 minutes. | |

Ces milieux sont oxalatés ou calcifiés à la concentration voulue au moyen de solutions 0,2 M d'oxalate de soude (2,7 p. 100) et 0,1 M (1,1 p. 100) ou 0,01 M (0,11 p. 100) de CaCl_2 , stérilisées à part.

2° PHAGES ET SOUCHES SENSIBLES. — Le phage L utilisé, provenant d'un filtrat de culture de cinq jours de bacille lysogène de Lisbonne en bouillon, a subi plusieurs passages sur la souche sensible de bacille dysentérique Y6R. Les stocks de phage destinés aux expériences sont préparés de la manière suivante : 10 ml d'une dilution 10^{-2} de phage L en bouillon ou en milieu B, additionnés de CaCl_2 à la concentration 0,001 M, sontensemencés de 11 gouttes de culture d'Y6R âgée de 24 heures ; après développement initial de la culture, on observe une lyse totale en quatre à cinq heures en bouillon et en sept à huit heures en milieu B. Le lysat est stérilisé par filtration sur bougie Chamberland L3 ou par addition de chloroforme, dès que la lyse est totale, l'expérience ayant montré que si l'on prolonge le séjour à 37° l'activité du lysat diminue rapidement. Les lysats filtrés ou chloroformés, constituant les stocks de phage L utilisés, contiennent en moyenne 10^7 phages par millilitre.

Le phage PF, utilisé occasionnellement, a été régénéré sur la souche sensible, soit coli ϕ R, en bouillon ou en milieu B, et stérilisé par addition de chloroforme.

3° TITRAGE DES PHAGES. — Les phages sont titrés par étalement sur gélose au bouillon nutritif, selon la méthode de la double couche de Gratia [13]; on ajoute toujours du CaCl_2 à la concentration 0,001 M au mélange phage + bactéries sensibles au moment de l'étalement.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1° ACTION LYTIQUE ET MULTIPLICATION DU PHAGE L EN BOUILLON. — Le phage L ayant subi plusieurs passages sur Y6R en bouillon additionné de 0,001 M CaCl_2 se comporte comme le phage originel (filtrat de culture de bacille lysogène de Lisbonne) étudié par J. Bordet [3]. Il ne lyse pas le bacille Y6R en bouillon oxalaté, ni même en bouillon nutritif non oxalaté, sans addition de calcium. Comme l'a signalé J. Bordet, certains lots de bouillon, moins alcalins que les autres, permettent toutefois la lyse; il suffit d'y ajouter de l'oxalate de soude à la concentration de 0,004 M pour empêcher la lyse. D'autre part, l'addition de 0,0001 M à 0,0002 M CaCl_2 à un lot de bouillon ne permettant pas la lyse introduit suffisamment de calcium dans le milieu pour que le phage L y lyse le bacille Y6R.

Pas plus que le phage originel, le phage L régénéré sur Y6R ne se multiplie en bouillon oxalaté.

EXPÉRIENCE I. — Dans deux tubes de bouillon contenant, l'un 0,001 M CaCl_2 et l'autre 0,008 M oxalate de soude, on introduit III gouttes de phage L régénéré sur Y6R et I goutte de culture d'Y6R en bouillon âgée de 24 heures. Le tube additionné de calcium est lysé en quatre heures à 37°, le tube oxalaté ne se lyse pas en vingt-quatre heures.

Le titrage du phage total pratiqué dans ces deux tubes, au moment de l'ensemencement et après vingt-quatre heures d'incubation à 37°, donne les résultats suivants :

| PHAGES PAR GOUTTE | BOUILLON + 0,001 M CaCl_2 | BOUILLON + 0,008 M oxalate |
|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| — | — | — |
| Au départ | 78 | 78 |
| Après 24 heures | 416 000 | 57 |

Multiplication en bouillon + calcium : $1,5 \times 10^3$.

En bouillon + calcium, le phage L s'est multiplié mille cinq cents fois, tandis qu'en bouillon oxalaté il n'a pas augmenté.

2° ACTION LYTIQUE ET MULTIPLICATION DU PHAGE L EN MILIEU B. — L'inconstance de la teneur en calcium du bouillon nutritif rendait désirable l'emploi d'un milieu de composition chimique définie ne contenant pas de calcium. Nous avons donc répété en

milieu synthétique de J. Bordet (milieu B) les expériences effectuées en bouillon.

En milieu B, le phage L régénéré sur Y6R ne lyse pas ce germe sans addition de calcium ; à plus forte raison n'observe-t-on pas de lyse si l'on ajoute de l'oxalate de soude au milieu. On obtient, par contre, facilement la lyse du bacille Y6R par le phage L en milieu B additionné de CaCl_2 : la concentration minimum de calcium permettant la lyse est égale à 0,0003 M CaCl_2 . On peut remplacer le chlorure par le nitrate ou le gluconate de calcium, qui se montrent actifs aux mêmes concentrations que le chlorure.

Comme la lyse, la multiplication du phage L en milieu B exige du calcium. Dans une expérience comparable à l'expérience I, mais réalisée en milieu synthétique, le phage L s'est multiplié plus de huit mille fois en milieu B + calcium et ne s'est pas multiplié du tout en milieu non additionné de calcium ou additionné d'oxalate : il tend au contraire à disparaître dans ces deux milieux.

Il est à remarquer que c'est le phage qui exige le calcium, car la bactérie se développe aussi bien en absence de cet élément, et l'on peut montrer également que cette bactérie permet la multiplication d'un autre phage, PF, et est lysée par lui, en milieu B sans addition de calcium ou additionné d'oxalate. Le besoin en calcium ne se manifeste donc pas pour tous les phages capables de lyser Y6R, un phage différent se reproduisant sur la même bactérie-hôte n'en exigeant pas.

3° FIXATION DU PHAGE L SUR LES GERMES SENSIBLES. — Dans le but de déterminer à quelle étape de la lyse le phage L exige du calcium, nous avons recherché tout d'abord s'il se fixe sur les germes sensibles en absence de calcium.

Dans une expérience préliminaire, nous avons comparé, au moment où la lyse est totale en bouillon + calcium, le phage libre dans ce milieu, à celui présent dans le bouillon + oxalate. Nous avons vu précédemment que le phage total se multiplie dans le bouillon + calcium, mais non dans le bouillon + oxalate : il était intéressant de rechercher ce qu'était devenu le phage dans ce dernier milieu.

EXPÉRIENCE II. — Dans deux tubes de bouillon contenant l'un 0,001 M CaCl_2 et l'autre 0,022 M oxalate de soude, on introduit XX gouttes de phage L et I goutte de culture de vingt-quatre heures d'Y6R en bouillon.

Après quatre heures d'incubation à 37° la lyse est totale en bouillon + calcium ; il n'y a aucune trace d'éclaircissement en bouillon + oxalate.

On titre à ce moment dans ces deux milieux :

1° Le phage total, par étalement sur Y6R de la culture + phage, préalablement refroidie dans la glace pour arrêter la multiplication du phage ;

2° Le phage libre, en centrifugeant dix minutes à 6 000 tours/min. la culture + phage refroidie et en étalant le liquide surnageant sur Y6R.

On obtient les résultats suivants :

| PHAGES PAR GOUTTE | BOUILLON + 0,001 M CaCl_2 | BOUILLON + 0,022 M OXALATE |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Introduits au départ | 559 | 338 |
| Après 4 heures à 37° : | | |
| Phage total | 53 300 | 143 |
| Phage libre | 41 600 | 195 |

On constate que tandis que le phage s'est abondamment multiplié en bouillon + calcium, il a diminué en bouillon + oxalate ; de plus, le phage que l'on retrouve dans ce dernier milieu est libre. On peut dès lors se demander si l'absence de reproduction du phage L en bouillon oxalaté n'est pas due à ce qu'il ne se fixe pas sur les germes dans ces conditions.

Or, l'expérience montre, en effet, qu'en absence de calcium le phage L ne se fixe pas sur Y6R.

Nous avons éprouvé tout d'abord certaines difficultés à démontrer la fixation du phage L sur Y6R. Il importe, en effet, comme l'expérience nous l'a appris, de ne pas utiliser, pour les expériences de fixation, des lysats ayant séjourné trop longtemps à 37°. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des phages préparés comme nous l'avons indiqué dans l'exposé des techniques, en filtrant ou en chloroformant les lysats dès que la lyse de la culture d'Y6R par le phage L est totale, soit après quatre heures à 37°. Dans les lysats ayant séjourné vingt-quatre heures à 37°, le phage a considérablement diminué et ce qu'il en reste se fixe très mal sur les bactéries sensibles.

EXPÉRIENCE III. — Deux tubes de 5 ml de culture de cinq heures d'Y6R en bouillon reçoivent, l'un 0,001 M CaCl_2 , l'autre 0,02 M oxalate de soude. Du phage L est introduit dans ces deux tubes, ainsi que dans deux tubes témoins de 5 ml de bouillon, additionné soit de 0,001 M CaCl_2 , soit de 0,02 M oxalate.

Au début de l'expérience, les tubes de culture contiennent par goutte $11,7 \times 10^6$ bactéries et 6×10^3 phages, soit une proportion d'une particule de phage pour 2 000 bactéries, de manière à éviter la fixation de plusieurs particules par bactérie.

Les tubes sont mis au bain-marie à 37° pendant trente minutes. Au sortir du bain-marie on titre dans les tubes le phage total et le

phage libre, selon la technique décrite dans l'expérience III, et l'on note les résultats suivants :

| | PHAGES PAR GOUTTE | | PHAGE FIXÉ p. 100 |
|--|-------------------|-------------|----------------------|
| | Phage total | Phage libre | |
| Cultures Y6R : | | | |
| Bouillon + CaCl ₂ | 11 700 | 1 200 | 90 |
| Bouillon + oxalate | 6 500 | 4 940 | 24 |
| Témoins : | | | |
| Bouillon + CaCl ₂ | 8 600 | | |
| Bouillon + oxalate | 4 700 | | |

En trente minutes, 90 p. 100 du phage L sont fixés sur Y6R en présence de calcium, contre 24 p. 100 seulement en présence d'oxalate : ce dernier gêne donc considérablement la fixation du phage L sur Y6R et cette expérience confirme l'hypothèse que c'est en empêchant la fixation du phage sur les bactéries sensibles que l'oxalate s'oppose à l'action lytique du phage L sur Y6R. Une légère augmentation du phage dans la culture + calcium indique que pendant les trente minutes d'incubation à 37°, une certaine reproduction du phage a déjà débuté, alors que rien de pareil ne se constate dans la culture + oxalate.

Nous avons répété l'expérience avec des cultures d'Y6R tuées par un chauffage de trente minutes à 60° et nous avons constaté de même que le phage L ne se fixe pas, ou seulement en proportion négligeable, sur les germes tués, en présence d'oxalate, alors qu'il se fixe en proportion élevée en présence de calcium.

Des essais destinés à comparer la fixation du phage L sur les cultures vivantes d'Y6R en bouillon nutritif non additionné de calcium d'une part, ou contenant 0,001 M CaCl_2 d'autre part, ont donné des résultats irréguliers : selon le lot de bouillon utilisé, le phage se fixe ou non sur Y6R en l'absence d'addition de calcium. Afin d'éviter ces irrégularités, dues aux teneurs variables en calcium des lots de bouillon différents, nous avons utilisé des cultures d'Y6R en milieu B.

EXPÉRIENCE IV. — De deux tubes de 5 ml de culture de cinq heures d'Y6R en milieu B, l'un reçoit 0,001 M CaCl_2 , l'autre ne reçoit pas de calcium. On ajoute du phage L à ces deux tubes ainsi qu'à deux tubes témoins de 5 ml de milieu B, dont l'un a reçu 0,001 M CaCl_2 .

Au début de l'expérience, les tubes de culture contiennent $6,5 \times 10^6$ bactéries et $1,04 \times 10^4$ phages par goutte, soit une proportion d'environ une particule de phage pour 625 bactéries.

Les tubes sont portés au bain-marie à 37° pendant trente minutes. Au sortir du bain-marie, on titre dans les tubes le phage total et le phage libre et l'on note les résultats suivants :

| | PHAGES PAR GOUTTE | | PHAGE FIXÉ p. 100 |
|--|-------------------|-------------|----------------------|
| | Phage total | Phage libre | |
| Cultures Y6R : | | | |
| Milieu B + CaCl ₂ | 12 900 | 540 | 96 |
| Milieu B sans Ca. | 10 900 | 9 100 | 16,5 |
| Témoins : | | | |
| Milieu B + CaCl ₂ | 8 840 | | |
| Milieu B sans Ca. | 8 060 | | |

La fixation de 96 p. 100 du phage L sur Y6R en milieu B + calcium contraste avec l'absence presque complète de fixation (16,5 p. 100) en milieu B sans calcium.

Le calcium paraît donc bien indispensable à la fixation du phage L sur Y6R. Il reste à déterminer quelle est la quantité minimum de CaCl_2 qu'il est nécessaire d'ajouter au milieu B pour que la fixation du phage sur le germe sensible y soit possible.

EXPÉRIENCE V. — Quatre tubes de 5 ml de culture de cinq heures d'Y6R en milieu B reçoivent respectivement 0,001 M, 0,0005 M, 0,0002 M, 0,0001 M CaCl_2 . Un cinquième tube de culture ne reçoit pas de calcium. A tous les tubes on ajoute du phage L.

Au début de l'expérience, les tubes contiennent $4,81 \times 10^6$ bactéries et $2,65 \times 10^3$ phages par goutte, soit une proportion d'environ une particule de phage pour 1 800 bactéries.

Les tubes séjournent au bain-marie à 37° pendant vingt minutes. Au sortir du bain-marie, on titre dans les tubes le phage total et le phage libre et l'on note les résultats suivants :

| MILIEU B | PHAGES PAR GOUTTE | | PHAGE FIXÉ p. 100 |
|--------------------------------------|-------------------|-------------|----------------------|
| | Phage total | Phage libre | |
| + 0,001 M CaCl_2 | 3 050 | 250 | 91 |
| + 0,0005 M CaCl_2 | 4 000 | 480 | 88 |
| + 0,0002 M CaCl_2 | 2 550 | 2 200 | 13,5 |
| + 0,0001 M CaCl_2 | 2 670 | 2 780 | 0 |
| Sans calcium | 2 100 | 3 100 | 0 |

La présence de 0,0005 M CaCl_2 permet la fixation de 88 p. 100 du phage L sur Y6R en milieu B ; avec 0,0002 M CaCl_2 la fixation est insignifiante. La quantité minimum de calcium nécessaire à la fixation du phage en milieu B est donc comprise entre 0,0005 M et 0,0002 M, c'est-à-dire qu'elle est très voisine de la concentration (0,0003 M) indispensable à la manifestation de l'activité lytique du phage L sur Y6R en milieu B.

Ceci nous porte à croire que c'est bien parce qu'il permet la fixation du phage sur la bactérie sensible que le calcium est nécessaire à la lyse du bacille Y6R par le phage L.

On peut se demander toutefois si le calcium n'agit pas dans la fixation en accélérant un processus, susceptible de se produire, mais plus lentement, en son absence. Il n'en est rien, comme le démontre l'expérience : alors qu'après dix minutes à 37° en milieu B contenant 0,001 M CaCl_2 il y a déjà fixation de 50 p. 100 du phage L sur Y6R, en absence de calcium ou même en présence de quantités insuffisantes telles que 0.0002 M ou 0,0001 M CaCl_2 , aucune fixation ne s'opère après des temps de contact prolongés allant jusqu'à vingt-quatre heures. Le calcium est donc absolument nécessaire en quantité déterminée pour que le phage L se fixe sur le bacille Y6R.

4° FIXATION DU PHAGE L SUR LES EXTRAITS BACTÉRIENS. — La fixation des phages sur les bactéries sensibles se fait par l'intermédiaire de récepteurs microbiens spécifiques (Burnet [14]), que l'on peut extraire des germes par des méthodes appropriées (Levine et Frisch [15]; Burnet [14]). Les récepteurs contenus dans les extraits bactériens confèrent à ceux-ci la propriété d'absorber le phage correspondant, en le rendant, de ce fait, inapte à se fixer encore sur la bactérie sensible : la fixation du phage sur les récepteurs contenus dans les extraits bactériens se décèle donc par l'inactivation de l'agent lytique.

Il était logique de supposer que la fixation du phage L sur les récepteurs contenus dans un extrait d'Y6R exigerait la présence de calcium, comme la fixation du phage sur la bactérie vivante. C'est bien ce que démontre l'expérience.

Nous avons préparé un extrait d'Y6R, selon la méthode utilisée par l'un de nous [16] pour l'extraction des récepteurs spécifiques de divers germes du groupe coli-dysentérique, et que nous nous bornerons à rappeler brièvement ici :

Des cultures de vingt-quatre heures sur gélose sont lavées trois fois en eau physiologique, avant d'être suspendues en eau distillée, à raison de 1 g de microbes pesés à l'état frais dans 5 ml d'eau distillée, et traitées par un volume égal d'acide trichloracétique N/2 pendant trois heures à + 5°. Après centrifugation, le liquide surnageant est écarté et le culot microbien est resuspendu en eau physiologique, à raison de 1 g de microbes pesés à l'état frais dans 10 ml d'eau physiologique. La suspension est amenée à pH 10 environ et laissée à + 5° pendant vingt-quatre heures ; le liquide plus ou moins opalescent que l'on sépare par centrifugation est neutralisé et constitue l'extrait alcalin (EB), contenant les récepteurs bactériens du phage.

Les essais de fixation du phage L sur l'extrait EB d'Y6R ont été effectués, soit avec un stock de phage préparé en bouillon, les dilutions étant faites dans ce même milieu, soit avec un stock de phage préparé en milieu B, dans lequel se font également les dilutions.

Les résultats des expériences effectuées en bouillon indiquent déjà clairement que la fixation du phage L sur l'extrait EB d'Y6R exige la présence de calcium. On ne constate, en effet, qu'une fixation faible (moins de 50 p. 100) si l'on n'ajoute pas de calcium au mélange de phage dilué et d'extrait, et l'addition d'oxalate de soude a pour effet d'empêcher toute fixation. Il y a par contre fixation de plus de 90 p. 100 du phage sur l'extrait EB d'Y6R en présence de 0,001 M CaCl_2 .

Il est donc clair que la fixation du phage L sur les récepteurs spécifiques contenus dans l'extrait EB d'Y6R exige la présence de calcium, tout comme la fixation du phage sur la bactérie vivante. Remarquons à ce propos que cette exigence en calcium est spécifique pour le phage L : en effet, l'extrait EB d'Y6R, qui contient également les récepteurs d'un autre phage, PF, capable de lyser Y6R en bouillon + oxalate, fixe aussi bien ce phage en bouillon + oxalate qu'en bouillon + calcium. Les récepteurs, produits par le même germe, mais correspondant soit au phage PF, soit au phage L, fixent le premier en absence de calcium, mais exigent la présence de cet élément pour la fixation du second.

Pour déterminer la quantité minimum de calcium nécessaire à la fixation du phage L sur l'extrait EB d'Y6R, nous avons utilisé un stock de phage L préparé en milieu B et réalisé les essais de fixation dans ce milieu.

EXPÉRIENCE VI. — Dix tubes contenant chacun X gouttes d'une dilution 10^{-3} de phage L en milieu B sont répartis en cinq paires. Quatre paires de tubes reçoivent des quantités décroissantes de CaCl_2 : 0,001 M, 0,0005 M, 0,0002 M, 0,0001 M ; dans la cinquième paire on n'introduit pas de calcium. Au premier tube de chaque paire on ajoute X gouttes d'extrait EB d'Y6R ; le second tube reçoit X gouttes d'eau physiologique et sert de témoin sans extrait.

Les tubes de mélange phage + extrait ou phage + eau physiologique séjournent vingt-quatre heures à l'étuve à 37° . Après incubation on titre dans chaque tube le phage resté libre, par étalement de V gouttes du mélange de phage et d'extrait ou d'eau physiologique sur une culture d'Y6R en boîte de Petri. Les résultats obtenus ont été les suivants :

| MILIEU B | NOMBRE DE TACHES | | PHAGE FIXÉ p. 100 |
|--------------------------------------|------------------|---------------------------|----------------------|
| | Série témoin | Série + extrait EB/Y6R | |
| — | — | — | — |
| + 0,001 M CaCl_2 | 1 275 | 42 | 96,7 |
| + 0,0005 M CaCl_2 | 1 130 | 56 | 95 |
| + 0,0002 M CaCl_2 | 1 000 | 540 | 46 |
| + 0,0001 M CaCl_2 | 1 100 | 490 | 55 |
| Sans calcium | 900 | 750 | 16,5 |

L'extrait EB d'Y6R ne fixe donc qu'une proportion négli-

geable (16,5 p. 100) du phage L en milieu B sans calcium ; la proportion fixée reste faible et voisine de 50 p. 100 lorsqu'on ajoute 0,0001 M ou 0,0002 M CaCl_2 au milieu. Par contre, l'addition de 0,0005 M CaCl_2 augmente considérablement la proportion de phage fixé, puisque dans ces conditions l'extrait absorbe 95 p. 100 du phage.

Il y a donc pour une teneur du milieu en CaCl_2 comprise entre 0,0002 M et 0,0005 M une augmentation massive de la proportion de phage L fixé par l'extrait EB d'Y6R. Il est remarquable que cette concentration minimum en CaCl_2 , nécessaire à une fixation presque complète du phage sur l'extrait d'Y6R, soit la même que celle exigée pour la fixation du phage sur les bactéries vivantes et tout à fait comparable à la quantité minimum de calcium qu'exige le phage L pour manifester son action lytique sur Y6R en milieu B.

5° MULTIPLICATION DU PHAGE FIXÉ. — S'il paraît certain que la fixation du phage L sur Y6R exige la présence de calcium, d'autres phages étudiés par Wahl [10] et par Adams [11], capables de se fixer sur les germes en absence de calcium, exigent par contre sa présence pour se multiplier dans les cultures de bactéries sensibles. Dans le cas du phage L, le calcium nécessaire à la fixation est-il aussi nécessaire à la multiplication ?

Nous avons recherché si le phage L fixé sur des bactéries Y6R en présence de calcium était capable de se multiplier lorsqu'on resuspend ces bactéries en milieu sans calcium.

EXPÉRIENCE VII. — 20 ml de culture d'Y6R de cinq heures en milieu B, contenant environ 8×10^6 bactéries par goutte, sont répartis en quatre tubes : deux de ces tubes reçoivent 0,001 M CaCl_2 , les autres ne reçoivent pas de calcium. On ajoute aux quatre tubes du phage L, à raison d'environ une particule pour 2 000 bactéries et on porte au bain-marie à 37° pendant vingt minutes.

Au sortir du bain-marie, on titre le phage total dans les quatre cultures, qui sont ensuite centrifugées dix minutes à 6 000 tours/min. après refroidissement. Après décantation du liquide surnageant, les culots microbiens sont resuspendus dans 5 ml de milieu B neuf et l'on titre le phage contenu dans ces culots resuspendus : on obtient ainsi directement la valeur du phage fixé sur les bactéries et, par comparaison avec le phage total, le pourcentage de phage fixé.

Ce pourcentage est respectivement de :

0,5 et 0 p. 100 pour la paire de tubes sans calcium ;

66 et 82,5 p. 100 pour la paire de tubes contenant 0,001 M CaCl_2 .

On ajoute alors 0,001 M CaCl_2 à un tube de chaque paire, de telle manière que l'on dispose des quatre combinaisons suivantes :

(O + Ca) bactéries additionnées de phage sans calcium, resuspendues en milieu B + calcium ;

(O + O) bactéries additionnées de phage sans calcium, resuspendues en milieu B sans calcium ;

(Ca + Ca) bactéries additionnées de phage + calcium, resuspendues en milieu B + calcium ;

(Ca + O) bactéries additionnées de phage + calcium, resuspendues en milieu B sans calcium ;

Ces quatre tubes sont remis au bain-marie à 37° et on y titre, par la méthode habituelle, le phage total après une heure et après vingt-quatre heures d'incubation. On obtient les résultats suivants (tableau I).

L'expérience démontre que le phage fixé sur les bactéries en présence de calcium ne se multiplie pas si le milieu, dans lequel on resuspend les bactéries après la fixation, ne contient pas de calcium ; il se multiplie, par contre, si le milieu en contient. De même le peu de phage qui s'est fixé sur les bactéries en absence de calcium se multiplie lorsqu'on resuspend les germes en milieu B + calcium.

TABLEAU I.

| TUBES | FIXATION | | RESUSPENSION | | |
|----------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| | en milieu B + | Phage fixé | en milieu B + | Nombre de phagos après | |
| | | | | 1 heure | 24 heures |
| 0 + Ca | 0 | 20 | 0,001 M CaCl ₂ | 190 | 9 200 |
| 0 + 0 | 0 | < 10 | 0 | < 10 | 30 |
| Ca + Ca . . . | 0,001 M CaCl ₂ | 3 800 | 0,001 M CaCl ₂ | 45 × 10 ³ | 6,5 × 10 ⁶ |
| Ca + 0 | 0,001 M CaCl ₂ | 3 800 | 0 | 5 000 | 2 700 |

Il semble donc que le calcium nécessaire à la fixation du phage L sur Y6R est indispensable aux étapes ultérieures de la reproduction du phage par la bactérie.

Nous avons cherché à savoir par quel mécanisme le calcium intervient dans la reproduction du phage par la bactérie, après avoir assuré sa fixation. Dans ce but, nous avons resuspendu des bactéries Y6R ayant fixé du phage L en présence de calcium, dans du milieu B contenant des quantités décroissantes de chlorure calcique ou n'en contenant pas du tout.

EXPÉRIENCE VIII. — A 25 ml de culture d'Y6R de cinq heures en milieu B, contenant environ 10⁶ bactéries par goutte, on ajoute 0,001 M CaCl₂ et du phage L à raison d'environ une particule pour 500 bactéries, et on porte le mélange au bain-marie à 37° pendant vingt minutes.

Au sortir du bain-marie, on titre le phage total dans la culture, qui est ensuite centrifugée dix minutes à 6 000 tours/min. après refroidissement. Le culot de centrifugation est resuspendu en 25 ml de milieu B neuf : on y titre le phage fixé sur les bactéries, soit environ 63 p. 100 du phage total.

On divise la suspension de bactéries ayant fixé le phage en cinq por-

tions ; à quatre d'entre elles, on ajoute respectivement 0,001 M, 0,0005 M, 0,0002 M, 0,0001 M CaCl_2 ; une cinquième portion ne reçoit pas de calcium.

Ces cinq portions sont remises au bain-marie à 37° et on y détermine le phage total et le phage libre après une heure et après vingt-quatre heures. Le tableau II donne un résumé des résultats obtenus.

TABLEAU II.

| BACTÉRIES + PHAGES L resuspendues en milieu B + | APRÈS 1 HEURE A 37° | | APRÈS 24 HEURES A 37° | |
|--|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | Multiplication du phage total | Phage libre p. 100 | Multiplication du phage total | Phage libre p. 100 |
| 0,001 M CaCl_2 . | 12 X | 23 | ± 100 X | 100 |
| 0,0005 M CaCl_2 . | 8 X | 25 | ± 300 X | 100 |
| 0,0002 M CaCl_2 . | 4 X | 50 | ± 200 X | 100 |
| 0,0001 M CaCl_2 . | 2 X | 100 | Pas de multipl. | 100 |
| Sans calcium . | 1,7 X | 100 | Diminution. | 100 |

On constate que le phage fixé sur les bactéries ne se multiplie que si on resuspend la culture en milieu contenant au moins 0,0002 M CaCl_2 . Des expériences analogues nous ont montré que la quantité minimum de calcium nécessaire est de 0,0002 M à 0,0005 M. Mais une constatation importante se dégage de ces expériences. Il semble que la multiplication du phage ne se poursuive que dans les cas où, au terme de la première heure d'incubation des bactéries chargées de phage, la proportion de phage fixé reste élevée. On constate, en effet, à la lecture du tableau II, que la reproduction du phage ne s'est poursuivie que là où, à la fin de la première heure d'incubation, le phage libre ne s'élève pas à plus de 25 à 50 p. 100. Par contre, en présence d'une quantité insuffisante ou en absence de calcium, tout le phage est libre après une heure d'incubation et la multiplication, peu importante pendant cette heure, ne se poursuit pas au cours des heures suivantes.

Il est probable que la reproduction du phage dans une culture contenant des bactéries ayant fixé le phage ne se poursuit que lorsque le milieu contient suffisamment de calcium pour assurer la refixation du phage libéré sur de nouvelles bactéries. On constate, en effet, que la quantité de calcium nécessaire à la poursuite de la multiplication du phage est du même ordre que celle qui permet sa fixation, et l'on a de bonnes raisons de croire que c'est à la refixation du phage libéré sur de nouvelles bactéries que le calcium est nécessaire au cours de la multiplication du phage.

L'expérience montre, en effet, que si l'on resuspend en

milieu B contenant 0,001 M CaCl_2 des bactéries ayant fixé du phage L et qu'on suit de dix minutes en dix minutes, pendant une heure, la reproduction du phage, on constate que celui-ci se multiplie, est libéré et se refixe sur de nouvelles bactéries sensibles. Par contre, si les bactéries chargées de phage ont été resuspendues en milieu B sans calcium, on constate une multiplication initiale accompagnée de libération du phage, mais ce phage libéré ne se refixe pas et la multiplication s'arrête. Il semble donc que le calcium soit essentiellement nécessaire à la fixation du phage L sur Y6R, et à la refixation sur de nouvelles bactéries sensibles du phage libéré au cours de la lyse bactériophagique, plutôt qu'à la reproduction du phage par la bactérie.

6° MODE D'ACTION DU CALCIUM SUR LA FIXATION. — La fixation du phage L sur les récepteurs spécifiques d'Y6R exige donc la présence de calcium, qui paraît jouer ainsi dans cette fixation le rôle de « cofacteur » au sens donné à ce terme par Th. F. Anderson [47]. Cet auteur a montré que le *l*-tryptophane est un cofacteur indispensable à la fixation du phage T4 sur le coli B. De l'étude détaillée qu'il a faite, il résulte que le *l*-tryptophane n'agit pas sur la bactérie, mais bien sur le phage, qu'il rend apte à se fixer sur le germe sensible.

Il ne semble pas en être de même pour le phage L : en effet, le simple contact du phage L avec le calcium ne rend pas le phage apte à se fixer sur la bactérie.

A cet effet, à du phage L non dilué on ajoute 0,0005 M CaCl_2 et on porte au bain-marie à 37° pendant vingt minutes. On dilue ensuite au 1/100 ce phage + calcium dans une culture d'Y6R en milieu B sans calcium ; la concentration de ce dernier dans la culture, après addition du phage, est donc de 0,000005 M CaCl_2 , c'est-à-dire qu'elle est absolument insuffisante pour permettre la fixation du phage. La culture additionnée de phage est portée au bain-marie pendant vingt minutes pour permettre au phage de se fixer sur les bactéries. Or le titrage du phage libre après centrifugation de la culture montre que le phage ne s'est pas fixé dans ces conditions. Le calcium ajouté au phage, préalablement au contact avec les bactéries, ne l'a pas rendu apte à se fixer sur les germes sensibles.

On ne peut davantage démontrer une action du calcium sur la bactérie, la rendant apte à fixer le phage dans un milieu non additionné de calcium. Nous avons lavé deux fois en milieu B sans calcium une culture d'Y6R obtenue en milieu B additionné de 0,0005 M CaCl_2 , et après resuspension en milieu B sans calcium nous y avons ajouté du phage L : nous n'avons observé aucune fixation du phage dans ces conditions. Il n'y a pas davantage fixation du phage L sur une culture d'Y6R additionnée de

0,0005 M CaCl_2 , puis lavée deux fois en milieu B sans calcium, après vingt minutes de contact avec le chlorure calcique.

Dans une dernière expérience, nous n'avons pas obtenu la fixation de phage additionné de 0,0005 M CaCl_2 , puis dilué cent fois dans une suspension de bactéries mises au contact de 0,0005 M CaCl_2 et lavées avant l'addition du phage.

Il ressort de ces expériences que la fixation du phage L sur Y6R exige la présence de calcium dans le milieu au moment où doit s'effectuer la fixation, le calcium intervenant vraisemblablement dans le phénomène d'adsorption du phage sur le récepteur bactérien.

DISCUSSION.

J. Bordet a montré que le calcium est nécessaire à l'action lytique du phage contenu dans les filtrats de cultures de bacille lysogène de Lisbonne (phage L). De nos expériences il résulte que le phage L régénéré sur le bacille dysentérique Y6R, comme le phage originel de Lisbonne, ne manifeste pas son action lytique et ne se reproduit pas en absence de calcium. En milieu synthétique (milieu B) la concentration minimum de chlorure, de nitrate ou de gluconate de calcium nécessaire à l'action du phage L est de 0,0003 M.

Le calcium étant indispensable à l'activité du phage L, la question se pose de savoir à quelle étape de la lyse le calcium intervient. Or, la fixation du phage L sur les cultures d'Y6R exige une concentration en CaCl_2 comprise entre 0,0005 M et 0,0002 M, c'est-à-dire dans les limites mêmes de la concentration requise pour la lyse. Il est par conséquent légitime de supposer que c'est en permettant la fixation du phage sur la bactérie sensible que le calcium intervient dans la lyse. Cette hypothèse nous paraît solidement étayée par le fait que la fixation du phage L sur un extrait d'Y6R contenant les récepteurs spécifiques du phage ne s'effectue qu'en présence d'une concentration minimum de CaCl_2 , qui est précisément la même que celle exigée pour la lyse. Ainsi donc, c'est la fixation du phage sur le récepteur spécifique de la bactérie qui nécessite la présence de calcium.

Remarquons que cette exigence en calcium est spécifique du phage et non de la bactérie. Le bacille Y6R est, en effet, sensible également à un autre phage, PF ; or, ce dernier lyse Y6R et se reproduit à ses dépens en absence de calcium. Corrélativement, l'extrait EB d'Y6R, qui contient les récepteurs spécifiques du phage PF, absorbe ce dernier en absence de calcium. Bien que se réalisant dans la même bactérie, l'union du récepteur spécifique et du phage PF est susceptible de s'effectuer sans calcium, tandis que celui-ci est indispensable à la fixation du phage L sur le récepteur correspondant.

D'autres auteurs, tels Gratia [6] et Delbrück [8] ont signalé l'existence de phages dont la fixation sur la bactérie sensible exige la présence de calcium. On ne peut cependant en conclure que c'est toujours pour assurer la fixation que le calcium est nécessaire aux phages qui requièrent sa présence. Wahl [40] et Adams [41] ont montré que certains phages exigeant du calcium sont capables de se fixer en son absence, mais ne se multiplient pas dans ces conditions. Il faut donc admettre que le calcium peut agir à des étapes différentes de la lyse selon le phage envisagé.

Dans les conditions de nos expériences, il semble que ce soit essentiellement la fixation du phage L sur la bactérie sensible qui exige du calcium, une intervention de ce dernier dans la multiplication du phage ne nous paraissant pas démontrée. Bien que la reproduction du phage fixé sur la bactérie ne se poursuive que si le milieu contient une quantité déterminée de calcium, il semble que ce dernier n'intervienne que pour permettre la refixation sur de nouvelles bactéries du phage libéré par la lyse. En l'absence de calcium, ce phage libéré ne se refixe pas et tend à disparaître. Cette tendance à la disparition manifestée par le phage L est-elle assimilable à la destruction rapide de certains phages en absence de calcium, signalée par Adams [48]? Le calcium, d'après cet auteur, jouerait un rôle très important en assurant la stabilité du phage. Le cas du phage L paraît plus complexe, car en l'absence de bactéries il ne se détruit que lentement en milieu sans calcium; c'est en présence des germes que ce phage diminue rapidement, lorsque le milieu ne contient pas une quantité de calcium suffisante à assurer sa reproduction.

Pour cette raison, nous ne pensons pas pouvoir écarter absolument la possibilité que le calcium soit nécessaire à d'autres étapes de la lyse d'Y6R par le phage L. Signalons à ce propos que Quersin et Dirkx [49] ont montré récemment que la lysine de ce même phage L ne lyse pas *Shigella dysenteriae* irradié en milieu privé de calcium par l'oxalate de soude. Il se peut toutefois, comme le suggèrent les auteurs, que là aussi le calcium intervienne dans un phénomène de fixation, celle de la lysine sur les récepteurs microbiens.

Nos expériences ne permettent pas d'imaginer de façon précise comment le calcium intervient dans la fixation du phage sur le récepteur bactérien. Des quelques tentatives que nous avons faites dans ce sens, il résulte que le calcium ne paraît pas agir comme le *l*-tryptophane, dont Th. F. Anderson [7, 47] a reconnu la nécessité pour la fixation du phage T4 sur le coli B. Le phage T4, mis au contact du *l*-tryptophane, devient apte à se fixer sur la bactérie en absence du cofacteur : Anderson considère que le phage a été « activé ». Cette « activation », le *l*-tryptophane ne la communique qu'au phage et non à la bac-

térie. Nous n'avons pu obtenir de résultats semblables avec le phage L : celui-ci n'acquiert pas par simple contact avec le calcium l'aptitude à se fixer sur le germe sensible. L'addition de calcium à la bactérie, soit au cours de son développement, soit peu avant la fixation, ne suffit pas à permettre l'absorption du phage, si la bactérie est lavée avant d'être mise au contact de ce dernier.

La fixation ne semble possible que lorsque le calcium est présent dans le milieu au moment même où se fait l'adsorption du phage sur le récepteur. Ceci peut s'expliquer de diverses façons, mais n'est pas incompatible avec une hypothèse avancée par Puck, Garen et Cline. Dans un article récent [20], ces auteurs supposent que les cations bivalents sont indispensables à la fixation de certains phages, parce qu'en s'adsorbant à des emplacements spécifiques de la surface du phage et peut-être aussi de la bactérie, ces cations déterminent la formation de deux configurations électrostatiques complémentaires, qui permettent l'accrolement du phage à la bactérie, en vertu de forces électriques d'attraction. Chose curieuse, les filtres de verre, dont on connaît le pouvoir d'absorption pour les phages, n'absorbent ceux dont la fixation sur la bactérie exige des cations bivalents ou du *L*-tryptophane, qu'en présence de ces mêmes cofacteurs. Il y a toutefois entre cette absorption par le filtre et la fixation sur le germe sensible des différences relevées par les auteurs. Mais cette fixation sur le verre montre l'importance du phénomène physique, dans la fixation du phage sur la bactérie. Ce dernier phénomène ne peut se produire que lorsque la bactérie possède le récepteur approprié, puisque les bactéries résistantes ne fixent pas le phage. On peut donc supposer que la présence des récepteurs chez la bactérie sensible constitue la base spécifique indispensable à l'adsorption du phage, mais que cette dernière ne pourrait s'effectuer sans le concours de forces électrostatiques, susceptibles d'être fournies pour certains phages par la répartition des ions Ca^{++} à la surface du phage et de la bactérie.

RÉSUMÉ.

1° Le phage de Lisbonne (phage L) régénéré sur Y6R ne lyse ce germe et ne se reproduit à ses dépens qu'en milieu (bouillon ou milieu synthétique) contenant une quantité de calcium, voisine de 0,0003 M de chlorure, de nitrate ou de gluconate de calcium.

2° Le phage L ne se fixe sur les cultures d'Y6R qu'en présence de 0,0005 M à 0,0002 M CaCl_2 .

3° L'absorption du phage L par l'extrait EB d'Y6R, contenant les récepteurs spécifiques du phage, ne s'effectue qu'en présence de calcium.

4° Le phage PF lyse Y6R et se multiplie à ses dépens en milieu oxalaté ; corrélativement, l'extrait d'Y6R fixe ce phage en absence de calcium.

5° La reproduction du phage L fixé sur les bactéries Y6R exige la présence de calcium, qui assure la refixation sur de nouvelles bactéries sensibles du phage libéré par la lyse.

6° Le calcium doit être présent dans le milieu au moment où le phage L se fixe sur Y6R, le contact avec le calcium, soit du phage, soit de la bactérie, soit des deux, préalablement à la fixation, ne permet pas à celle-ci de s'effectuer dans un milieu dépourvu de calcium.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. STASSANO et A. C. DE BEAUFORT. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1380.
- [2] F. M. BURNET et MAC KIE. *J. Path. a. Bact.*, 1933, **37**, 179.
- [3] J. BORDET. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 403.
- [4] J. BORDET et E. RENAUX. *Ces Annales*, 1928, **42**, 1283.
- [5] J. BORDET et P. BORDET. *Bull. Acad. R. Méd. Belgique*, 1941, **6**, 617.
- [5 bis] J. BORDET et P. BORDET. *Ces Annales*, 1946, **72**, 161 et 321.
- [6] A. GRATIA. *Bull. Acad. R. Méd. Belgique*, 1940, **4**, 232.
- [7] Th. F. ANDERSON. *J. Cell. a. Comp. Physiol.*, 1945, **25**, 17.
- [8] M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1948, **56**, 1.
- [9] C. H. ANDREWES et W. J. ELFORD. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 13.
- [10] R. WAHL. *Ces Annales*, 1946, **72**, 73.
- [11] M. H. ADAMS. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 505.
- [12] D. I. SHEW. *Nature*, 1949, **164**, 492.
- [13] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1936, **57**, 652.
- [14] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 285.
- [15] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1932-1933, **30**, 933 ; *ibid.*, 1933, **31**, 46.
- [16] J. BEUMER. *Rev. Belge Path. Méd. exp.*, 1947, **18**, 244.
- [17] Th. F. ANDERSON. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1946, vol. XI, 1.
- [18] M. H. ADAMS. *J. Gen. Physiol.*, 1949, **32**, 579.
- [19] L. QUERSIN et J. DIRKX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 378.
- [20] Th. T. PUCK, A. GAREN et J. CLINE. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 65.

LE TITRAGE DU *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AUX ANTIBIOTIQUES INSOLUBLES DANS L'EAU

par P.-J. COLETSOS, M^{lle} M.-J. LAROCHE et M^{lle} É. ORIoT (*).

(Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose.)

Les milieux de culture solides présentent des avantages incontestables pour l'étude de la sensibilité du *Mycobacterium tuberculosis*, effectuée soit dans un but clinique, soit dans un but de recherches [1].

En pratique, leur emploi a été réduit par l'obligation d'incorporer l'antibiotique au milieu avant sa coagulation.

En effet, la plupart des antibiotiques hydrosolubles étant thermolabiles subissent une perte notable de leur pouvoir bactériostatique lors du chauffage nécessaire à la coagulation du milieu.

Pour certains produits même, le processus destructif une fois déclenché se poursuit durant toute la période d'incubation de la culture.

Dans une communication précédente [2] nous avons rapporté une méthode de titrage sur milieu solide permettant d'éviter cet écueil.

L'originalité de notre méthode consiste :

Dans l'imprégnation du milieu de culture par l'antibiotique en surface ; cette opération étant effectuée après la coagulation du milieu et, de ce fait, évitant tout chauffage de l'antibiotique ;

Dans l'évaluation de la sensibilité du *Mycobacterium tuberculosis* d'après le taux d'antibiotique réparti sur la surface du milieu au centimètre carré et non d'après la concentration au centimètre cube.

Quelle que soit la méthode utilisée, le titrage de la sensibilité du *Mycobacterium tuberculosis* offre des difficultés supplémentaires lorsque les produits sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau.

Pour l'effectuer, une série d'opérations préliminaires est nécessaire :

La solubilisation du produit actif à l'aide d'un solvant organique volatil ;

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1951.

L'adjonction à la solution d'un produit de suspension et de dispersion, et enfin

L'évaporation par chauffage au bain-marie du solvant et sa substitution par de l'eau bidistillée stérile.

Ce n'est qu'à partir de cette suspension mère, ainsi obtenue, qu'on prépare les dilutions nécessaires au titrage.

Ces opérations préliminaires et l'adjonction d'un dispersant sont-elles indispensables et sans inconvénient? C'est ce que nous avons voulu vérifier.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Nous avons cherché à établir l'influence et le rôle respectifs sur la culture du *Mycobacterium tuberculosis* de quatre dispersants : Twen 80, Nonex, Span 20 et Span 80, dont les caractéristiques essentielles figurent sur le tableau I (1).

TABEAU I.

| | NOM | | | |
|----------------------|---------------------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|
| | Twen 80 | Nonex 53 | Span 20 | Span 80 |
| Formule | Polyoxyméthylène sorbitan monooléate. | Monostéarate de polyéthylène glycol 600. | Sorbitan mono-laurate. | Sorbitan mono-oléate. |
| Aspect à 25° C. . . | Liquide huileux, jaune d'or. | Graisse solide légèrement colorée, point de fusion 32°. | Liquide huileux ambré. | Liquide huileux ambré. |
| Viscosité Cp 25 C. . | 350-550. | | 3 500-5 000. | 900-1 150. |
| Solubilités : | | | | |
| Eau | Soluble. | Soluble à chaud. | Dispersible. | Dispersible. |
| Alcool | Soluble. | Soluble. | Soluble. | Soluble à certaines concentrations. |
| Ether | Soluble. | Soluble. | Soluble. | Peu soluble. |
| Acétone | Soluble. | Soluble. | Soluble à haute concentration. | Insoluble. |

A cet effet, nous avons utilisé 2 souches, la H₃₇Rv et la Brévannes, à la concentration de 10⁻³ et 10⁻⁴ mg par tube.

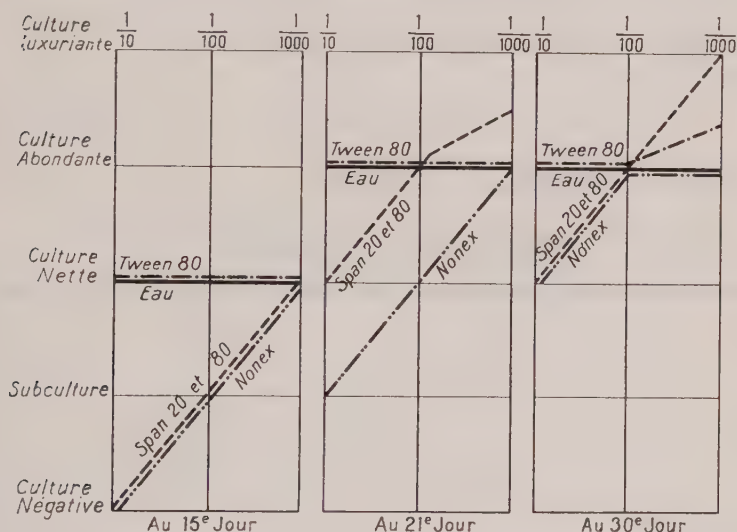
Culture sur milieu de Löwenstein-Jensen distribué et coagulé en tubes de Legroux offrant 50 cm² de surface.

(1) Les dispersants nous ont été obligeamment fournis par M. A. P. C. I. et par la Société des Produits pour l'Industrie et l'Agriculture.

Chaque série de tubes, douze heures avant l'ensemencement du milieu, est imprégnée de 0,5 cm³ d'un des quatre dispersants ci-dessus mentionnés. Chaque produit dispersant est étalé sur trois séries de tubes et aux concentrations de 1/10, 1/100 et 1/1 000. Parallèlement une série à l'eau tournesolée à 30 p. 100 a été ensemencée.

Les résultats schématisés dans le tableau II ont été les suivants :

TABLEAU II.



Le Tween 80 se comporte de façon identique à l'eau tournesolée à 30 p. 100. La très faible différence dans le développement des colonies en comparaison avec l'eau, plus perceptible au trentième jour de la culture, pourrait être attribuée au fait que nos deux souches H₃₇Rv et Brévannes sont depuis longtemps entretenues en milieu de Dubos au Tween 80.

Le Span 20 et le Span 80 aux fortes concentrations exercent un certain pouvoir bactériostatique, alors qu'à la concentration 1/1 000 et après le vingtième jour de culture, ils se comportent comme « facteur de croissance » du bacille.

Le Nonex retarde davantage la culture aux fortes concentrations, mais ce pouvoir de bactériostase relative devient imperceptible à la concentration 1/1 000 et au trentième jour de la culture.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

Elle a consisté à titrer les souches H₃₇Rv et Brévannes aux trois antibiotiques insolubles suivants :

Acide para-amino-salicylique,

Tbl et

1358 F ou sulfone mère.

La suspension mère des antibiotiques a été faite comme indiqué précédemment.

Les dilutions ultérieures nécessaires au titrage dans l'eau tournesolée à 30 p. 100.

En outre, pour chaque produit, une série a été faite exclusivement à l'eau tournesolée sans adjonction préalable d'un dispersant.

Le comportement des deux souches a été identique pour les quatre produits.

RÉSULTATS.

Pour le PAS (acide), cf. tableau III.

TABLEAU III. — **Titrage au P. A. S. (acide), H₃₇Rv et Brévannes.**
Lecture au trentième jour.

| | P. A. S. (ACIDE) | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 0,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 0,08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |
| Eau tournesolée à 30 p. 100 . | ++ | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tween 80. | ++ | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Span 20 | | ++ | | 0 | 0 | 0 |
| Span 80 | | ++ | | 0 | 0 | 0 |
| Nonex | | + | | 0 | 0 | 0 |

On ne relève aucune différence notable dans l'activité du PAS (acide) dans les différents dispersants et l'eau.

En plus, nous avons remarqué le *parallelisme complet* dans le titrage effectué avec le PAS de Na hydrosoluble et le PAS (acide) très peu soluble dans l'eau.

Pour le Tbl, cf. tableau IV.

Le Tbl en suspension dans le Span 20 et le Span 80 s'est montré dix fois moins actif pour les souches H₃₇Rv et Brévannes que dans l'eau tournesolée à 30 p. 100 et le Tween 80, et deux fois moins actif en suspension dans le Nonex.

Pour le 1358 F ou sulfone mère, cf. tableau V.

TABLEAU IV. — Titrage au Tbl, H₃₇Rv et Brévannes.
Lecture au trentième jour.

| | Tbl | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |
| Eau tournesolée à 30 p. 100. | ++ | + | + | + | + | 0 | 0 |
| Tween 80. | ++ | ++ | ++ | + | + | 0 | 0 |
| Span 20. | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Span 80. | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Nonex. | ++ | ++ | + | + | + | 0 | 0 |

TABLEAU V. — Titrage du 1358 F, H₃₇Rv et Brévannes.
Lecture au trentième jour.

| | SULFONE MÈRE OU 1358 F | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |
| Eau tournesolée à 30 p. 100. | ++ | ++ | + | + | 0 |
| Tween 80. | ++ | ++ | + | + | 0 |
| Span 20. | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Span 80. | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Nonex. | ++ | ++ | + | + | 0 |

L'activité bactériostatique du 1358 F a été très réduite en présence de Span 20 et 80.

De ces deux expériences, il résulte que l'emploi de produits de suspension et de dispersion, apparemment indispensables pour le titrage du *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques insolubles dans l'eau, n'est pas sans inconvénients.

En effet, 3 produits sur 4 étudiés dans les conditions d'expérience que nous venons de décrire se sont révélés bactériostatiques aux concentrations élevées et 2, le Span 20 et le Span 80, se sont comportés comme « facteur de croissance » à la concentration de 1/1 000 à une période tardive de la culture (vingtième au quarante-cinquième jour).

D'autre part :

a) Leurs propriétés physiques ne sont pas rigoureusement définies et les échantillons peuvent varier d'une production à l'autre ;

b) Leur *viscosité*, qui favorise la dispersion des particules, constitue sans doute un obstacle au contact intime de l'antibiotique avec les bacilles ;

c) Leur emploi nécessite le *chauffage* du produit actif et toute une série d'opérations préliminaires difficiles à réaliser dans des conditions de stérilité requises.

Aussi nous ne conseillons plus que l'eau tournesolée à 30 p. 100.

TECHNIQUE. — L'antibiotique est cristallisé dans des conditions telles qu'il offre des particules de plus faibles dimensions possibles. Il est ensuite *porphyrisé* ; on obtient ainsi des particules de l'ordre du μ .

On pèse le produit actif dans une fiole stérile, bouchant à l'émeri, contenant des billes de verre, jaugée spécialement. Par simple addition de la quantité complémentaire d'eau bidistillée stérile on obtient une suspension mère. A l'aide des billes et par agitation vigoureuse et prolongée, le principe actif est dispersé dans l'eau ; à partir de cette suspension mère on effectue rapidement dans de l'eau tournesolée à 30 p. 100 les dilutions nécessaires au titrage. On doit toujours agiter la dilution avant la répartition des quantités convenables de produit actif sur le milieu de culture solide et procéder aussitôt à l'étalement (2).

Après un séjour de six à huit heures à l'étuve à 37° le milieu de culture est sec, à aspect lisse et vernissé, teinté uniformément en bleu par le tournesol et prêt à l'ensemencement de la souche ou du produit pathologique bacillifère qu'on désire étudier.

Le temps optimum pour la lecture se situe entre le vingtième et le trentième jour de culture.

La sensibilité *normale* des bacilles pour les trois produits étudiés est indiquée dans les tableaux correspondants.

Toutefois, si la lecture est effectuée après le quarantième jour de culture ou si l'ensemencement a été trop massif, il n'est pas rare de voir apparaître des colonies fines sur le premier tube normalement inhibiteur.

Le parallélisme des résultats entre le PAS de Na hydrosoluble

(2) Afin de faciliter l'étalement nous conseillons d'introduire 0,5 cm³ par tube de la dilution convenable et non 0,25 cm³ comme nous l'indiquions (Ces *Annales*, 1950, 79, 292).

L'opération même des dilutions s'en trouvera également simplifiée : on utilisera la dilution à 100 μ g pour le tube de Legroux de 50 cm² de surface, qui titre 1 μ g, 500 μ g pour 5, 1 000 pour 10, etc.

et le PAS (acide) très peu soluble dans l'eau confirme la précision de la méthode.

En conclusion : Le titrage précis de la sensibilité du *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques très peu solubles ou insolubles dans l'eau est d'une réalisation facile.

L'utilisation de la méthode d'imprégnation en surface mise au point par nous offre cette possibilité.

Comme pour les produits hydrosolubles, l'évaluation de la sensibilité est faite d'après le taux d'antibiotique réparti sur la surface du milieu au centimètre carré.

Elle se révèle d'une pratique facile pour les titrages dans un but clinique et un procédé de choix pour l'étude de l'activité bactériostatique des antibiotiques dans les laboratoires de recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. G. KARLSON et G. M. NEEDHAM. *Proceed. Staff. Meet.*, Mayo Clinic, 1948, **23**, n° 18. — J. BRETEY, P. J. COLETSOS et H. BOISVERT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 188. — G. YOUNG, I. ABDULLA, J. SWEANY et H. SWEANY. *Am. Rev. Tub.*, 1950, **61**, 569-581.
- [2] P. J. COLETSOS, H. BOISVERT et M^{lle} E. ORIOU. *Ces Annales*, 1950, **79**, 288. — P. J. COLETSOS et H. BOISVERT. *Rev. Tub.*, 1949, **43**, 344-346.

ÉTUDE DE L'ACTION DE LA CHLOROMYCÉTINE SUR LA MULTIPLICATION DU BACTÉRIOPHAGE

par E. EDLINGER (*).

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage et C. N. R. S.)

Dans des publications antérieures, nous avons, avec M. Faguet [1, 2], étudié, principalement au moyen du microbiophotomètre, l'action de la Chloromycétine sur une culture de staphylocoque Twort soumise au bactériophage homologue. Nous avons montré que la Chloromycétine, ajoutée en même temps que le phage, inhibe la lyse bactériophagique. L'addition de l'antibiotique avant ou après l'introduction du phage jusqu'au moment où la lyse va commencer, empêche également celle-ci de se produire; une forte dose permet même d'interrompre la lyse amorcée. Sans posséder une action destructive directe sur le bactériophage lui-même, la Chloromycétine diminue toujours le titre en « centres infectieux » d'une culture bactérienne infectée avec un lysat phagique. Cette orientation sommaire donne seulement la possibilité d'émettre l'hypothèse d'une action de l'antibiotique contre le phage en multiplication sur ou dans la cellule bactérienne. Nos recherches antérieures ont révélé plusieurs aspects intéressants de ce problème, mais il nous a paru nécessaire de continuer l'expérimentation pour confirmer notre opinion sur l'action de la Chloromycétine.

TECHNIQUES. — Les bactériophages étudiés étaient le bactériophage staphylococcique Twort dont le germe sensible est le staphylocoque blanc Twort, et les bactériophages T_1 et T_3 de la série T actifs sur *Escherichia coli* souche B. Nous avons choisi le premier système bactérie-bactériophage parce que c'était celui que nous avions utilisé dans nos expériences antérieures, et le deuxième système, parce qu'il représente le complexe bactérie-bactériophage le plus étudié ces dernières années (Demerec et Fano [3], Delbrück [4]). Le milieu utilisé était, pour *Escherichia*

(*) Société française de Microbiologie, séance du 7 juin 1951.

coli, le bouillon de viande, et pour le staphylocoque, l'eau peptonée à 3 p. 100.

Pour les titrages de phages, nous avons utilisé la méthode de Gratia [5] : 0,1 cm³ de la dilution de bactériophage à titrer est prélevé et reporté dans un petit tube ; on ajoute II gouttes d'une suspension dense de bactéries sensibles provenant d'une culture sur gélose inclinée de dix-huit heures à 37°. Après mélange, on verse 3 cm³ d'un bouillon gélosé à 0,7 p. 100 maintenu liquide dans un bain-marie à 50°. Le tout est coulé à la surface d'une plaque de gélose constituée par 30 cm³ de gélose ordinaire à 2 p. 100. Le mélange bactérie-phage gélose à 0,7 p. 100 se solidifie rapidement au contact de la gélose à 2 p. 100 ; il forme, après séjour à l'étuve à 37° pendant seize heures, une pellicule d'une culture continue dans laquelle les plages apparaissent nettement.

Les principes de nos recherches s'inspiraient de l'expérience de la multiplication à cycle unique (« one step growth experiment ») de Delbrück et Luria [6] et de l'expérience du rendement individuel de cellules bactériennes (« single burst experiment ») de Burnet [7] et de Delbrück [8].

La technique choisie pour l'expérience de la multiplication à cycle unique a été la suivante : un tube contenant 10 cm³ du milieu reçoit 0,1 cm³ d'une suspension bactérienne provenant d'une culture sur gélose inclinée de dix-huit heures à 37°C. Ce tube est placé au bain-marie à agitation mécanique à 37° C pendant quatre à cinq heures. La culture bactérienne a atteint environ 10⁸ bactéries. A ce moment, on ajoute une quantité connue du phage approprié et le mélange reste encore cinq minutes à l'agitation. La fixation d'une grande quantité de phages se produit et le mélange est dilué à 10⁻⁴ dans de l'eau glacée, ce qui arrête toute nouvelle fixation. Des échantillons de 0,1 cm³ sont versés dans des tubes de bouillon de 10 cm³ ; ainsi la dilution du mélange originel est de 10⁻⁶. La dilution du mélange à 10⁻⁴ et une dilution d'un bouillon ne contenant que le phage servant de témoin sont centrifugées pendant cinq minutes à 3 400 t/m. Le titrage du surnageant donne le nombre de phages libres et le titrage du témoin le nombre total de phages. La différence donne le nombre de phages fixés. Comme nous avons toujours utilisé un excès de bactéries (« single infection »), on peut admettre que le nombre de phages infectants correspond au nombre de bactéries infectées.

Les tubes de la dilution à 10⁻⁶ en bouillon sont mis au bain-marie à 37° C. L'un sert de témoin et les autres reçoivent l'antibiotique au moment voulu. A des temps différents, on prélève 6,1 cm³ pour le titrage des phages. La dilution est suffisamment grande pour qu'une fixation des phages provenant des bactéries

nouvellement lysées soit négligeable. La différence entre le nombre des phages totaux et celui des phages libres, divisée par le nombre des bactéries infectées donne le rendement moyen d'un cycle de multiplication du phage (burst size).

Pour étudier le rendement individuel des cellules bactériennes en phages, nous avons à nouveau procédé à la fixation des bactéries et à la dilution à 10^{-6} dans des tubes de bouillon renfermant ou non la Chloromycétine. Mais le contenu est ensuite distribué dans une série de petits tubes de telle manière que le nombre moyen des bactéries infectées soit inférieur au nombre des tubes. Ces tubes sont placés au bain-marie à 37° C et le contenu entier est titré. Les boîtes de gélose ensémençées avec une partie des tubes ne renfermant pas de bactéries infectées ne montrent pas de plages ou seulement celles qui sont produites par les phages non fixés, tandis que les autres montrent des plages en différente quantité provenant de la libération des corpuscules. Le rendement individuel d'une bactérie unique par la lyse est donné par le nombre total des plages moins celui des phages libres. Le rendement moyen peut être contrôlé par une expérience simultanée avec la dilution à 10^{-6} . En général, les temps de lyse sont plus longs et les rendements plus faibles dans nos expériences que dans les expériences standard. Mais il ne nous a pas été possible de réaliser en particulier l'aération constante des cultures et l'utilisation de milieux plus favorables. D'ailleurs, la présence du témoin permet la comparaison permanente avec les modifications que produit l'antibiotique. D'autre part, la lecture des publications des différents auteurs prouve que les résultats standard sont rarement réalisés. Enfin, le ralentissement de la lyse facilite les manipulations difficiles.

La Chloromycétine (chloramphénicol) provenait des échantillons commerciaux Park, Davis et C^o, en capsule de 0,25 g. 50 mg de poudre étaient dissous par chauffage à 70° C dans de l'eau bidistillée à raison de 50 μ g par centimètre cube. Les concentrations utilisées étaient, pour le staphylocoque de 2,5 μ g par centimètre cube et pour le coli de 0,5 μ g. Ces concentrations sont dans la zone sub-bactériostatique pour lesquelles la croissance bactérienne n'est que très faiblement entravée, comme des expériences préliminaires l'ont montré.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — Nous ne donnons ici que le protocole de quelques expériences types; de nombreuses autres expériences nous ont donné des résultats similaires.

I. *Comparaison de la multiplication du phage en présence de Chloromycétine et en milieu simple.* — 1^o Expérience de multiplication à cycle unique avec le staphylocoque Twort et son phage, selon la technique décrite ci-dessus. 2,5 μ g de Chloro-

mycétine sont ajoutés au tube de la dilution finale avant l'introduction du mélange bactéries-phages.

| | | |
|--|------------|-------------------|
| Bactéries au début. | 2.10^8 | par cm^3 |
| Phages totaux. | $2,8.10^7$ | — |
| Phages libres | $1,6.10^7$ | — |
| Calcul des bactéries infectées | $1,6.10^7$ | — |

| TEMPS APRÈS L'INFECTION (en minutes) | TITRES EN CORPUSCULES/ CM^3 | |
|---|--------------------------------------|-------------------------------|
| | Témoin | 2,5 μg de chlorom. |
| 10. | 2.10^7 | 2.10^7 |
| 15. | 2.10^7 | 3.10^7 |
| 20. | 3.10^7 | 2.10^7 |
| 30. | 129.10^7 | 26.10^7 |
| 35. | 124.10^7 | 31.10^7 |
| 44. | 126.10^7 | 28.10^7 |
| 50. | 121.10^7 | 26.10^7 |
| Rendement moyen en corpusc./bact.. | 107 | 25 |

2° Même expérience avec *E. coli* et phage T_1 . 0,5 μg de Chloromycétine :

| | | |
|--|----------|-------------------|
| Bactéries au début. | 5.10^8 | par cm^3 |
| Phages totaux. | 1.10^8 | — |
| Phages libres | 3.10^7 | — |
| Calcul des bactéries infectées | 7.10^7 | — |

| TEMPS APRÈS L'INFECTION (en minutes) | TITRES EN CORPUSCULES/ CM^3 | |
|---|--------------------------------------|-------------------------------|
| | Témoin | 0,5 μg de chlorom. |
| 10. | 10.10^7 | 8.10^7 |
| 15. | $7,8.10^7$ | $9,4.10^7$ |
| 20. | 4.10^9 | $2,38.10^9$ |
| 25. | $4,5.10^9$ | $2,23.10^9$ |
| 30. | $4,2.10^9$ | $2,49.10^9$ |
| 40. | $4,3.10^9$ | $2,3.10^9$ |
| 50. | $4,5.10^9$ | $2,3.10^9$ |
| Rendement moyen en corpusc./bact.. | 64 | 37 |

3° Même expérience avec *E. coli* B et phage T_3 :

| | | |
|--|------------|-------------------|
| Bactéries au début. | $3,5.10^8$ | par cm^3 |
| Phages totaux. | $7,6.10^7$ | — |
| Phages libres | $3,4.10^7$ | — |
| Calcul des bactéries infectées | $3,2.10^7$ | — |

| TEMPS APRÈS L'INFECTION (en minutes) | TITRES EN CORPUSCULES/CM ³ | |
|---|---------------------------------------|----------------------|
| | Témoin | 0,5 µg de chlorom. |
| 10. | 9.10 ⁷ | 10.10 ⁷ |
| 15. | 12.10 ⁷ | 8.10 ⁷ |
| 20. | 14.10 ⁷ | 23.10 ⁷ |
| 30. | 4,3.10 ⁹ | 1.10 ⁹ |
| 40. | 4,2.10 ⁹ | 1,43.10 ⁹ |
| 50. | 4,5.10 ⁹ | 1,27.10 ⁹ |
| Rendement moyen en corpusc./bact.. | 139 | 43 |

D'après ces expériences, nous voyons que l'addition de Chloromycétine n'empêche pas la lyse, mais diminue le rendement moyen en corpuscules, pour les 3 phages étudiés.

II. *Rendement individuel sous l'influence de la Chloromycétine.* — La diminution du rendement moyen peut s'expliquer de plusieurs façons : 1° l'action prolongée de la Chloromycétine sur les bactéries rendrait une partie des cellules inaptées à libérer le phage ; la Chloromycétine diminuerait réellement le rendement individuel.

Dans la première hypothèse, la série des tubes qui reçoivent la Chloromycétine devrait comporter plus de tubes négatifs, c'est-à-dire de tubes dans lesquels aucune multiplication du phage ne se produirait, que la série des tubes témoins. Au contraire, le rendement individuel des tubes positifs devrait être égal dans les deux séries.

Si la deuxième hypothèse est exacte, le nombre de tubes positifs doit être égal dans la série témoin et dans la série addi-

| | Tubes en expérience | Tubes positifs | Tubes négatifs | Bactéries intéctées par tube | Moyenne arithmétique des rendements individuels | Valeurs extrêmes du rendement | Rendement de l'expérience simultanée du cycle unique |
|---|------------------------|----------------|----------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|---|
| 1° Expérience avec le staphylocoque Twort et son phage selon la technique décrite plus haut. | | | | | | | |
| Témoin | 40 | 19 | 21 | 0,74 | 88 | 16 à 120 | 129 |
| 2,5 µg de Chlorom./cm ³ . | 39 | 24 | 15 | 0,74 | 17 | 5 à 49 | 23 |
| 2° Expérience avec <i>E. coli</i> et phage T ₁ . | | | | | | | |
| Témoin | 72 | 16 | 54 | 0,4 | 79,5 | 35 à 117 | 143 |
| 0,5 µg de Chlorom./cm ³ . | 70 | 17 | 53 | 0,4 | 27,9 | 8 à 59 | 45 |

tionnée de Chloromycétine, mais les tubes positifs de la deuxième série montreront en moyenne un nombre plus faible de corpuscules.

Enfin, si les deux hypothèses sont exactes, on doit obtenir moins de tubes positifs et, pour chacun de ceux-ci, un rendement plus faible que dans les tubes témoins.

Bien qu'il eût été désirable de multiplier le nombre des expériences, nos résultats nous permettent d'affirmer que la Chloromycétine diminue sensiblement le rendement individuel des cellules infectées, mais ne les empêche pas de synthétiser le phage.

III. *Importance du moment d'introduction de la Chloromycétine sur la multiplication du phage.* — Les expériences rapportées plus haut ne peuvent pas renseigner sur le moment de l'action de la Chloromycétine ; d'autre part, il était intéressant d'étudier plus particulièrement la période de latence du phage, située entre le moment de l'infection de la bactérie et la libération de corpuscules.

Nous avons utilisé à nouveau la technique de l'expérience du cycle unique, mais nous avons préparé une série de tubes à la dilution 10^{-6} , qui ont reçu la Chloromycétine à différents moments.

1° Expérience avec le staphylocoque Twort et son phage :

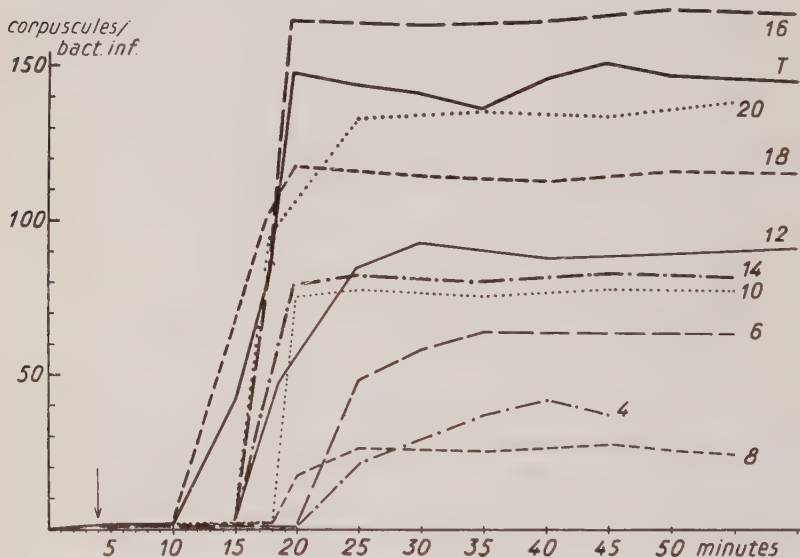
| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Bactéries | 1.10^8 par cm^3 |
| Phage | 3.10^7 — |
| Phage libre | 2.10^7 — |
| Bactéries infectées | 1.10^7 — |

| TEMPS (en minutes) | TÉMOIN | 2 μg DE CHLOROM./ CM^3 SONT AJOUTÉS A | | | | |
|-----------------------|------------|--|-----------|-----------|------------|------------|
| | | 8 min. | 10 min. | 12 min. | 15 min. | 20 min. |
| 10 | 1.10^7 | 3.10^7 | | | | |
| 15 | 2.10^7 | | 3.10^7 | | 3.10^7 | 4.10^7 |
| 20 | 2.10^7 | 4.10^7 | | 3.10^7 | 4.10^7 | 4.10^7 |
| 25 | 64.10^7 | 5.10^7 | 14.10^7 | 28.10^7 | 68.10^7 | 61.10^7 |
| 46 | | 27.10^7 | 33.10^7 | 38.10^7 | 76.10^7 | 63.10^7 |
| 54 | 103.10^7 | 24.10^7 | | 45.10^7 | 100.10^7 | 133.10^7 |
| Rendement moyen . | 100 | 24 | 30 | 43 | 97 | 131 |

2° Même expérience avec *E. coli* B et phage T_3 :

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Bactéries | 2.10^8 par cm^3 |
| Phages totaux | $8,5.10^7$ — |
| Phages libres | $4,2.10^7$ — |
| Bactéries infectées | $4,3.10^7$ — |

| TEMPS après l'infection (en minutes) | TÉMOIN | 0,5 µg DE CHLOROM.-/CM ³ SONT AJOUTÉS A | | | | |
|--|---------------------|--|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 8 min. | 10 min. | 12 min. | 15 min. | 20 min. |
| 10 | 8 .10 ⁷ | | | | 9.10 ⁷ | |
| 15 | 9.10 ⁷ | 11.10 ⁷ | | | | 6.10 ⁷ |
| 20 | | | 9.10 ⁷ | 11.10 ⁷ | | |
| 25 | 74.10 ⁷ | 9.10 ⁷ | 16.10 ⁷ | 38.10 ² | 40.10 ⁷ | 46.10 ⁷ |
| 30 | 220.10 ⁷ | 24.10 ⁷ | 22.10 ⁷ | 116.10 ⁷ | 78.10 ⁷ | 184.10 ⁷ |
| 50 | 234.10 ⁷ | 76.10 ⁷ | 96.10 ³ | | 188.10 ⁷ | 222.10 ⁷ |
| Rendement moyen corp./bact. | 52.3 | 16.8 | 21.4 | 24.7 | 42.8 | 50.7 |



Expérience de multiplication à cycle unique (*Escherichia coli* B, phage T₁). Bactéries, $1,2 \times 10^8$; phages totaux, 4×10^7 ; phages libres, $2,8 \times 10^7$; calcul des bactéries infectées, $1,2 \times 10^7$; Y, fin de la fixation; T, courbe témoin; traits en pointillés, résultats obtenus (0,5 µg de chloromycétine ajoutés de quatre à vingt minutes après l'infection). Les chiffres accompagnant les courbes indiquent les temps d'introduction de l'antibiotique.

3^e Expérience avec *E. coli* et phage T₁ (voir graphique).

Ces résultats permettent d'affirmer que la Chloromycétine n'agit sur la multiplication que pendant la phase de latence.

Au cours de celle-ci, on pourrait distinguer deux, peut-être même trois phases de sensibilité inégale à la Chloromycétine : une phase de début pendant laquelle le rendement diminue consi-

dérablement, une phase intermédiaire au cours de laquelle l'influence défavorable de l'antibiotique s'affaiblit; enfin, une phase terminale d'indifférence à l'antibiotique dans laquelle le rendement en phage est égal au rendement des témoins. On peut également supposer que lorsque l'antibiotique est ajouté pendant la première phase de la période de latence, il provoque un certain retard dans le processus lytique.

DISCUSSION.

Ainsi, nos expériences semblent confirmer l'hypothèse que nous avons formulée, d'une action de l'antibiotique sur le phage en multiplication sur ou dans la cellule bactérienne. Sans pouvoir préciser le mécanisme de la multiplication du phage, on peut cependant spécifier quelques modalités de l'action de l'antibiotique: celui-ci agit d'une façon dépressive sur le rendement des cellules bactériennes en corpuscules, mais il n'interrompt pas complètement, aux concentrations employées, la multiplication du phage.

La multiplication du phage est sensible à l'action de l'antibiotique, surtout au début de la phase de latence: elle devient ensuite moins sensible, puis finalement, elle cesse d'être influencée.

Nous n'avons pas pu distinguer une différence appréciable dans le comportement des trois phages étudiés, mais il est possible que des recherches ultérieures sur d'autres phages en montreront.

Il nous paraît intéressant de comparer nos résultats avec ceux des expériences entreprises par différents auteurs sur la multiplication intracellulaire du phage.

Ainsi, Latarjet [9], Luria et Latarjet [10] observent trois périodes dans la sensibilité aux rayons X d'une bactérie infectée avec un phage.

La sensibilité croît avec le temps, ce qui est interprété comme une augmentation du nombre des corpuscules.

Cohen et Anderson [11], Cohen et Fowler [12] obtiennent une inhibition de la multiplication du phage T_2 par le 5-méthyl-tryptophane et R. Foster [13], par la proflavine. Il est remarquable que, dans les deux cas, l'inhibition complète n'est obtenue que si les substances inhibitrices sont introduites avant douze à quatorze minutes depuis l'infection. Malgré les conditions différentes entre ces expériences et les nôtres, il semble possible de voir une analogie entre elles et d'apporter un nouvel argument à l'hypothèse suivant laquelle les réactions essentielles en rapport avec la multiplication du phage se situent tôt dans la phase de latence.

En ce qui concerne l'action de la Chloromycétine plus spécialement, on pourrait penser que cette substance intervient, aux concentrations employées, d'une façon modérée dans une de ces réactions essentielles à un moment où le métabolisme de la cellule bactérienne est déjà dévié par l'infection phagique, alors que la multiplication ne s'est pas encore produite. Ceci, naturellement, ne nous renseigne en rien sur les processus enzymatiques qui sont en jeu.

Si on compare nos résultats présents avec les résultats que nous avons obtenus antérieurement, on constate que le retard de la lyse est dû à une diminution du rendement moyen en corpuscules par les bactéries lysées. On pourrait donc supposer que l'inhibition de la lyse d'une culture bactérienne, comme celle que nous avons constatée précédemment, est due à un empêchement complet de la multiplication du phage par des concentrations élevées de Chloromycétine : mais il est impossible de faire des expériences de multiplication à cycle unique, parce que la bactériostase qui se produit avec de telles doses transforme complètement les données expérimentales.

RÉSUMÉ.

Par les expériences de multiplication du phage à cycle unique et du rendement individuel d'une bactérie infectée, nous avons constaté que la Chloromycétine introduite à des concentrations sub-bactériostatiques, au début de la phase de latence, diminue le rendement en corpuscules des bactéries lysées, tandis que lorsque, à la fin de la phase de latence, l'antibiotique est ajouté à la culture, la multiplication du phage reste normale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1950, **79**, 472.
- [2] E. EDLINGER et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1950, **79**, 436.
- [3] M. DEMEREC et U. FANO. *Genetics*, 1945, **30**, 119.
- [4] M. DELBRÜCK. *Biol. Rev.*, 1946, **21**, 30.
- [5] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1936, **57**, 652.
- [6] M. DELBRÜCK et S. E. LURIA. *Arch. Biochem.*, 1942, **1**, 111.
- [7] F. M. BURNET. *Brit. J. exp. Path.*, 1929, **10**, 109.
- [8] M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1945, **50**, 131.
- [9] R. LATARJET. *J. Gen. Physiol.*, 1948, **31**, 529.
- [10] S. E. LURIA et R. LATARJET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 149.
- [11] S. S. COHEN et T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 525.
- [12] S. S. COHEN et C. B. FOWLER. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 771.
- [13] R. FOSTER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.

**COMPARAISON DES QUANTITÉS DE POLYOSIDES
EXTRAITES DE SOUCHES SENSIBLES ET RÉSISTANTES
A LA DIHYDROSTREPTOMYCINE
CHEZ CERTAINES BACTÉRIES A GRAM NÉGATIF**

par J. SERVANT.

(Institut Pasteur. Service du professeur MACHEBOEUF
et Laboratoire central de Bactériologie du Service de Santé
[Médecin Colonel JUDE].)

Nous avons comparé la teneur en polyosides de souches de certaines bactéries à Gram négatif sensibles à des concentrations de dihydrostreptomycine inférieures à 2 $\mu\text{g/ml}$ et de souches de même espèce résistant à des concentrations de cet antibiotique comprises entre 10^4 et 2.10^5 $\mu\text{g/ml}$. Les bactéries étaient analysées au cours de leur vingt-quatrième heure de culture. De fortes différences se sont manifestées le plus souvent.

1° SOUCHES UTILISÉES. — Nous avons utilisé les souches bactériennes suivantes :

Salmonella typhi J. 564 possédant les antigènes O, H et Vi (forme vw) ;

Salmonella typhi O 901 possédant les antigènes O ;

Salmonella enteritidis (Var. Danysz-Le Minor), O, H ;

Escherichia coli (Schæffer), O, H et K.

2° OBTENTION DES SOUCHES RÉSISTANTES. — Ces souches furent obtenues à partir des souches sensibles par des cultures successives en bouillon ordinaire (1) en présence des concentrations croissantes de dihydrostreptomycine suivantes :

2, 5, 25, 250, 2 000, 10 000, 40 000, 100 000, 200 000 microgrammes par millilitre (2).

Les souches résistant à une concentration donnée étaient cultivées trois à dix fois dans les mêmes conditions avant d'êtreensemencées dans le milieu de concentration immédiatement supérieure.

(1) Bouillon glucosé à 6 p. 1 000 dans le cas de *Esch. coli*.

(2) Pour les concentrations très élevées, le sulfate de dihydrostreptomycine fut directement ajouté dans le bouillon à l'état solide.

Nous avons obtenu ainsi des souches résistant à 200 000 $\mu\text{g/ml}$ sans aucune difficulté à partir des souches sensibles de *S. enteritidis* et *E. coli* ; en ce qui concerne les deux souches *S. typhi* utilisées, le passage d'un stade au suivant, particulièrement à partir de 10^4 $\mu\text{g/ml}$, s'accompagnait de phases de latence fort longues (vingt-quatre à quarante-huit heures), mais diminuant progressivement au fur et à mesure des repiquages successifs, tout en demeurant de l'ordre de plusieurs heures. En cultivant ces souches résistantes en l'absence d'antibiotique, le temps de latence devenait immédiatement beaucoup plus court et du même ordre que celui des souches résistantes de *S. enteritidis* et *E. coli*.

Les souches résistantes, comme les souches sensibles, ont donné sur milieu nutritif gélosé sans antibiotique des colonies de taille normale et présentant l'aspect morphologique *smooth*. Leurs suspensions en eau physiologique étaient stables et inagglutinables par le réactif de Millon.

Nous n'avons donc pas observé de colonies d'aspect rugueux telles qu'il en a été décrit par Caputi [1] pour des souches de *S. typhi* résistant à 80 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine.

L'aspect microscopique des souches résistant à 250 $\mu\text{g/ml}$ ou à plus encore correspondait assez bien à celui décrit déjà par d'autres auteurs [1, 2, 3], pour d'autres *Salmonella* : formes coccoides, formes gonflées, allongées ou même formes filamenteuses (3).

3° CONDITIONS DE CULTURE. — Avant utilisation, les souches résistantes ont été repiquées trois fois en bouillon ordinaire sans dihydrostreptomycine afin d'éliminer les traces d'antibiotique. Nous avons vérifié que la résistance se conservait bien dans ces conditions.

On sait [4] que les cultures de bactéries résistantes présentent une phase de latence supérieure de deux à trois heures à celle des cultures de bactéries sensibles. Nous avons donc analysé les cultures de bactéries sensibles et résistantes au cours de la vingt-quatrième heure après l'ensemencement, alors que la croissance était terminée. Dans ces conditions, la quantité de bactéries résistantes recueillie était voisine de celle des bactéries sensibles correspondante.

Toutes les cultures ont été effectuées à 37° C.

S. enteritidis a été cultivée en milieu synthétique dialysable non gélosé ; *E. coli* en bouillon ordinaire glucosé à 6 p. 1 000 non gélosé.

(3) Certaines de nos cultures de souches résistantes présentaient divers caractères macroscopiques (voile, flocons) et microscopiques (formes dipolaires) dont nous renvoyons l'étude à un mémoire spécial.

Le milieu nutritif était réparti à raison de 2 l par ballon dans des ballons de 6 l agités mécaniquement ; l'air pouvait diffuser à travers le bouchon par le coton peu tassé.

S. typhi fut cultivée sur milieu solide dans des boîtes de Roux (bouillon ordinaire gélosé à 1,5 p. 100).

4° MÉTHODE D'EXTRACTION DES POLYOSIDES. — Nous avons utilisé le principe que Webb [5] a proposé pour l'extraction des polyosides totaux de certaines bactéries à Gram positif, mais nous avons dû l'adapter au cas de nos bactéries à Gram négatif :

Les bactéries (vivantes) sont traitées pendant cinq heures par de l'eau bouillante. On élimine l'insoluble par centrifugation ; le liquide est acidifié à pH 3,5 par de l'acide acétique et porté trois heures à 4° C. On centrifuge pour éliminer le précipité formé. Le liquide contient les polyosides ; on lui ajoute 1 p. 100 d'acétate de sodium, puis 4 volumes d'éthanol. Après vingt-quatre heures à 4° C, on recueille les polyosides précipités par centrifugation. On les remet en solution dans un peu d'eau, à pH 6,5, et l'on élimine des protéines en ajoutant 5 p. 100 d'acide trichloracétique (laisser agir deux heures à la glacière). On répète les précipitations par l'alcool et par l'acide trichloracétique en portant les durées de contact à quarante-huit heures pour l'alcool et seize heures pour l'acide, jusqu'à ce que l'acide trichloracétique ne produise plus de précipité (en général trois fois). Après dialyse contre l'eau distillée, on ajoute 2 p. 100 d'acétate de sodium, puis 5 volumes d'éthanol ; les polyosides sont centrifugés après séjour de quarante-huit heures à la glacière, lavés à l'alcool et séchés à l'éther. Cette méthode qui conduit à des produits moins purs que celle de M^{lle} Staub [6] a l'avantage de faire subir aux polyosides des manipulations moins brutales que l'ébullition en milieu acide. Elle nous a donné des résultats constants pour les bactéries étudiées et permet d'extraire aussi bien les polyosides de l'antigène O que les polyosides capsulaires de l'antigène K de *E. coli* : dans le cas de la souche sensible, nous avons obtenu

un rapport $\frac{\text{polyosides}}{\text{poids sec}}$ de 8.2 p. 100, or les polyosides de l'antigène O extraits par la méthode de Boivin représentaient seulement 2,7 p. 100. Notre extrait de polyosides totaux contenait 2 p. 100 d'azote et 1,7 p. 100 de phosphore. Notre méthode ne permet pas d'extraire les polyosides de l'antigène Vi, ainsi que des essais sérologiques nous l'ont montré (4).

(4) On sait que l'antigène Vi est soluble dans l'alcool [7] ; nous avons évaporé à sec, à 40°, sous vide, l'alcool ayant servi aux précipitations : la substance obtenue, reprise par l'eau, donne une très faible réaction avec un sérum anti-Vi.

D'autre part, nous obtenons bien les polyosides et non des complexes protéo-lipido-glucidiques comme donnerait, par exemple, la méthode de Roivin. En effet, l'hydrolyse de notre extrait (dans le cas de *S. enteritidis*, souche sensible) par l'acide acétique dilué chaud ne libère qu'une très faible proportion d'une substance insoluble dans l'éther ; le polyoside avant hydrolyse contenait 2,35 p. 100 d'azote et 1,75 p. 100 après hydrolyse.

Les polyosides que nous obtenons réagissent très bien avec les antisérums correspondants, mais nous n'abordons pas aujourd'hui l'aspect immunologique du problème.

5° RÉSULTATS OBTENUS :

| | EXTRAIT POLYOSIDIQUE TOTAL pour 100 de poids sec | |
|--|---|---|
| | Souche sensible | Souche résistante |
| <i>Salmonella typhi</i> , J564 | 4,2 | 1,7 (Résistant à 10^4 µg/ml.) |
| <i>Salmonella typhi</i> , O901 | 0,77 | 0,76 (Résistant à $4 \cdot 10^4$ µg/ml.) |
| <i>Salmonella enteritidis</i> , var. Danysz. | 3 | 0,86 (Résistant à $2 \cdot 10^5$ µg/ml.) |
| <i>Escherichia coli</i> | 8,2 | 2,8 (Résistant à $2 \cdot 10^5$ µg/ml.) |

En somme, si l'on admet que l'extrait polyosidique total obtenu par notre méthode donne une idée exacte de la teneur en polyosides des souches, on peut conclure que, dans la majorité des cas, la souche résistante est beaucoup moins riche en polyosides que la souche sensible dont elle dérive. C'est seulement dans le cas très particulier de *Salmonella typhi* O 901 que les teneurs en polyosides furent égales dans les cultures résistantes et sensibles ; or dans ce cas, la souche sensible elle-même est très pauvre en polyosides : 0,77 p. 100 et il s'agit d'une souche entretenue depuis trop longtemps au laboratoire.

Les variations que nous observons dans les autres cas sont vraisemblablement en rapport avec des variations de l'antigène O défini selon Boivin. En effet, dans le cas de *S. enteritidis* que nous avons étudiée de ce point de vue, les quantités d'antigène O complet extraites par la méthode de Boivin [8] à partir des deux souches varient dans le même sens que nos extraits totaux (anti-

gène 0 p. 100 de poids sec : souche sensible, 6,8 ; souche résistante, 1,5).

Pour vérifier enfin que les différences observées ne provenaient pas de différences dans l'état de développement ou d'autolyse de nos cultures, nous avons refait les expériences pour *Salmonella typhi* J 564 en analysant les corps bactériens de la souche résistante à la quinzième heure après l'ensemencement de la culture et nous avons trouvé une teneur en extrait polysidique de 1,9 p. 100, qui correspond à très peu près à celle obtenue en analysant les bactéries récoltées à la vingt-quatrième heure.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CAPUTI. G. *Batt. Immun.*, 1950, **41**, 369-373.
- [2] PRICE. J. *Bact.*, 1947, **53**, 481.
- [3] SCANGA. R. C. *Ist. Sup. San.*, 1950, **13**, 241-338.
- [4] GROS et BELJANSKI. C. R. *Acad. Sci.*, 1950, **230**, 875.
- [5] WEBB. J. *Gen. Microbiol.*, 1948, **2**, 260.
- [6] A. M. STAUB et R. COMBES. *Ces Annales*, 1951, **80**, 21.
- [7] C. A. STUART et E. R. KENNEDY. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1948, **68**, 455.
- [8] A. BOIVIN in C. MESROBEANU. *Thèse Sciences*, Strasbourg, 1936, p. 17.

TEST DE SÉRO-PROTECTION ANTITYPHOÏDIQUE SUR L'EMBRYON DE POULET

par M^{me} J. GRABAR et M^{me} S. LE MINOR (*).

(Institut Pasteur.)

Pour apprécier la valeur d'un vaccin antityphoïdique ou l'immunité acquise par un sujet vacciné ou par un ancien malade, nous avons utilisé jusqu'à présent le test de séro-protection sur la Souris, à propos duquel nous avons publié une étude en 1944 [1].

Mais dans ce test, l'emploi de la Souris, animal peu sensible au bacille typhique, nous oblige à utiliser de telles quantités de microbes (75 000 000 à 100 000 000 au centimètre cube en injection intrapéritonéale avec Ty2) que la mort de l'animal est liée à une action toxique et non à la virulence de la souche injectée pour cet animal. Enfin, le résultat de la méthode sur Souris varie trop selon le lot d'animaux utilisé, et, même avec des Souris de race déterminée et d'élevages contrôlés, ce résultat n'est pas toujours constant [2]. Ce sont ces raisons qui nous ont amenées à rechercher un test biologique plus sensible et plus fidèle, et nous nous sommes proposé d'étudier la valeur du test de séro-protection sur embryon de poulet. Nous avons choisi cette méthode en nous basant sur les conclusions tirées par Weill et Gall dans leur publication de 1941 [3], selon lesquelles l'embryon de poulet est très sensible à une infection au bacille d'Eberth.

En effet, seules quelques souches de bacille typhique, en particulier Ty2, sont capables de provoquer la mort de la Souris à des doses de l'ordre de 100 000 000 de germes en injection intrapéritonéale. Par contre, nous verrons que sur l'embryon de poulet, toutes les souches sont pathogènes, ce qui permet de généraliser l'emploi de cette dernière méthode et d'étudier les réactions croisées de sérums et de souches de formules antigéniques variées.

Le but de notre travail est d'étudier un test de séro-protection antityphoïdique sur l'embryon de poulet.

La première étape de notre recherche a été la mise au point de la technique, aussi rigoureuse que possible. Nous exposerons ensuite les résultats obtenus avec cette technique.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 10 mai 1951.

I. — MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

1° OEUFS. — Nous avons utilisé des œufs fécondés de la race Rhodes-Island. Pour toute documentation sur l'embryologie, l'installation et le matériel, ainsi que sur les techniques d'inoculation, nous renvoyons le lecteur au livre de Beveridge [4] ou au traité sur les Ultravirus des Maladies humaines, de C. Levaditi et P. Lépine [5].

A chaque arrivage, les œufs sont mis à l'étuve à 39°, dans une atmosphère humide, en position verticale, pour localiser l'embryon et les autres substances contenues dans l'œuf. Le premier mirage est fait le neuvième jour, et seuls sont retenus les œufs ayant une chambre à air bien délimitée, un embryon vivant, des membranes et des vaisseaux développés. Les œufs sont alors remis en position horizontale à l'étuve, l'embryon et la partie vasculaire étant tournés vers le haut. Puis, après un deuxième contrôle, le onzième jour, ils sont inoculés.

Au cours de nos essais, le poids des œufs a varié de 50 à 60 g et nous avons utilisé des embryons de huit jours ou de onze jours. Dans la suite, nous avons adopté ces derniers qui nous donnèrent des résultats plus réguliers. D'après les travaux de Weil, les embryons de quatorze jours sont beaucoup moins sensibles aux inoculations de bacille typhique.

2° SUSPENSIONS MICROBIENNES. — Les suspensions microbiennes sont préparées à partir d'une culture de dix-huit heures sur bouillon ordinaire gélosé à 2 p. 100, récoltée dans l'eau physiologique à 0,85 p. 100. Nous avons essayé de travailler en injectant des cultures sur bouillon diluées en eau physiologique, mais nous avons abandonné cette méthode. En effet, le bouillon non ensemencé, introduit dans l'œuf fécondé, est toxique pour l'embryon de poulet, comme nous l'avions constaté antérieurement pour la Souris, tandis que l'eau physiologique à 0,85 p. 100 est sans effet. Les suspensions en eau physiologique d'une culture sur bouillon gélosé n'agissent donc que par l'élément microbien.

La teneur en germes des suspensions microbiennes ainsi préparées est d'abord titrée par la méthode photométrique. Le nombre de germes vivants inoculés est vérifié par la méthode de numération en boîte de Petri. En général, les chiffres obtenus par les deux méthodes concordent; ainsi, une suspension titrée au photomètre et diluée de manière à obtenir 20 germes au centimètre cube donne au comptage par culture 14 à 15 colonies, pour 200 germes, 150 à 180 colonies. Chaque fois que des discordances se sont présentées, nous les avons mentionnées dans les protocoles d'expériences.

Nous avons employé les suspensions microbiennes à des dilu-

tions croissant en progression arithmétique (50, 100, 150, 200, 250 et 300 germes au centimètre cube) et en progression géométrique de raison 10, c'est-à-dire 20, 200, 2 000 germes, etc. Cette dernière méthode nous a donné des résultats plus réguliers, et c'est celle que nous avons définitivement adoptée. En général, nous avons obtenu 50 p. 100 de mortalité (L50) en injectant de 2 à 20 germes sous le volume de 0,1 cm³. Pour chaque expérience de séro-protection, nous avons injecté parallèlement aux œufs traités par le sérum, des œufs témoins qui ne recevaient que la suspension microbienne. Nous parlerons plus loin des souches utilisées dans nos expériences. Nous mentionnerons seulement ici que nous avons travaillé avec des souches en formes V, W et VW. La détermination des différentes formes antigéniques a été faite par sélection des colonies d'une souche dissociée, par le test d'agglutination sur lame et en tubes, de la culture obtenue à partir de la colonie choisie, vis-à-vis des sérums spécifiques, et enfin par sa sensibilité au bactériophage Vi du type phagique correspondant.

3° SÉRUMS. — Les sérums utilisés ont été soit des sérums de lapins, soit des sérums humains, conservés sans antiseptique, mais dont la stérilité était toujours contrôlée avant leur étude. Les sérums ont été injectés purs et dilués. Les résultats obtenus avec des sérums purs et des dilutions au 1/2 ont été assez discordants, si l'on considère la progression des dilutions, c'est-à-dire que nous avons eu plus d'embryons morts avec des sérums purs ou dilués au 1/2 et au 1/5 qu'avec des sérums dilués aux 1/10, 1/20 et 1/40, avec lesquels la progression s'est montrée régulière. Nous avons pensé à une action toxique des sérums sur les embryons de poulets, qui pourrait être expliquée par le travail de Baumann et Witebsky [6] sur l'antigène de Forssman des embryons de poulets, et les réactions antigène-anticorps qui en résultent, si on leur inocule des sérums purs ou peu dilués.

Ces résultats nous ont amenées à adopter la dilution au 1/10 du sérum. Les résultats obtenus au cours d'essais préliminaires avec 0,1, 0,2, 0,3 cm³ étant sensiblement identiques, et la dose de 0,1 cm³ étant recommandée par Weil et Mc Farlane [7], nous avons utilisé cette dernière dans nos expériences de séro-protection.

Nous avons travaillé avec des sérums contenant des agglutinines O, H et Vi, ou un seul de ces facteurs, ces derniers étant obtenus par injection de souches sélectionnées ne contenant qu'un seul facteur antigénique. L'épuisement de certaines agglutinines des sérums a été ainsi évité, car la méthode d'épuisement nécessite un contact assez prolongé des germes et du sérum, contact pendant lequel les microbes libèrent une partie de leurs antigènes

dans le sérum. Il en résulte un effet toxique du sérum, observé par Weil pour le bacille dysentérique, et que nous avons nous-mêmes constaté en épuisant un sérum anti-G. L. par de l'extrait trichloracétique. Le pouvoir agglutinant de nos sérums a été établi par titrage en tube à l'étuve à 37° des agglutinines vis-à-vis des antigènes spécifiques.

L'étude comparative, d'une part de l'action d'un sérum à une dilution fixe en faisant varier le nombre de germes inoculés, et, d'autre part, de l'emploi d'un sérum à des dilutions progressives vis-à-vis du même nombre de germes, nous a amenées à choisir la première méthode pour notre travail. La comparaison des œufs témoins et des œufs traités ayant reçu le même nombre de germes donne plus de sûreté à l'interprétation des résultats obtenus.

4° L'évaluation de tous nos résultats a été faite d'après la méthode de Reed et Muench [8], c'est-à-dire en prenant pour base le nombre de microbes donnant 50 p. 100 de mortalité (L50) et en introduisant la rectification par les totaux cumulatifs. La protection est exprimée en nombre de germes au point de 50 p. 100 de survivants.

INTRODUCTION DES SÉRUMS ET DES SUSPENSIONS MICROBIENNES.

Nous avons tout d'abord étudié l'introduction des sérums dans les œufs en les inoculant dans le jaune d'œuf la veille du dépôt des suspensions sur la membrane chorio-allantoïde d'une part, et en déposant simultanément le mélange sérum-suspension microbienne sur la membrane chorio-allantoïde d'autre part. Les résultats obtenus ayant été sensiblement les mêmes, nous avons opté pour la seconde technique, celle-ci nous évitant des manipulations répétées sur l'œuf, et par conséquent éliminant les risques de contaminations et les traumatismes multiples.

La technique de l'inoculation de l'œuf par la membrane chorio-allantoïde a été celle décrite dans le livre de Beveridge (1). Cependant, au lieu d'aspirer l'inoculat déposé sur la membrane coquillière après décollement de la membrane chorio-allantoïde, nous le déposons directement sur celle-ci au moyen d'une seringue graduée, ce qui évite les pertes accidentelles du mélange, et permet un dosage plus rigoureux. Une fois l'inoculation terminée, on obture les orifices de la coquille au moyen d'un ruban adhésif transparent et incolore (marque Durex).

(1) Nous remercions M^{lle} Cataigne et MM. Hannoun et Reinié pour nous avoir initiées à la technique de l'inoculation au début de notre travail.

C'est la méthode couramment employée au Service des Virus de l'Institut Pasteur ; elle dispense de l'emploi de la paraffine.

Le dépôt du mélange sérum-suspension (0,2 cm³, préparé extemporanément) sur la membrane chorio-allantoïde est pratiqué sur des embryons de poulets de 11 jours. Après l'inoculation, les œufs sont remis à l'étuve et on procède à leur examen trois jours après. On ouvre alors tous les œufs et on compte les embryons morts et vivants. A partir de tous les œufs morts, nous faisons des ensemencements sur gélose pour nous assurer qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle.

C'est avec cette technique que nous avons abordé l'étude du pouvoir protecteur des sérums de lapins hyperimmunisés par différentes souches de bacille typhique, sérums qui contiennent des agglutinines O, H et Vi, ou une seule de ces espèces d'agglutinines.

Pour effectuer ce travail, nous avons dû éprouver d'abord la sensibilité de l'embryon de poulet vis-à-vis de différentes souches de bacille typhique.

SENSIBILITÉ DE L'EMBRYON DE POULET VIS-A-VIS DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE BACILLE D'EBERTH.

Comme nous l'avons déjà dit, nous avons utilisé des souches de bacille d'Eberth de compositions antigéniques différentes. Nous avons étudié l'action des souches W : O 901, T 50-5, T 50-45, ces souches étant spontanément des souches O, sans antigène Vi, et des souches W obtenues par dissociation d'une souche VW (T 415). Nous n'avons pas tenu compte de l'antigène H de ces souches, notre travail se limitant, pour le moment, aux antigènes O et Vi et à leurs agglutinines réciproques.

Les embryons de 11 jours reçoivent, après décollement de la membrane chorio-allantoïde, 0,1 cm³ d'une suspension diluée selon une progression géométrique, mélangée à 0,1 cm³ d'eau physiologique stérile à 0,85 p. 100. L'eau physiologique remplace, dans les épreuves témoins, le sérum dilué au 1/10 employé dans le test de séro-protection. Le tableau I résume les résultats des expériences effectuées avec les souches O 901 et T 50-5.

L'action des souches V, c'est-à-dire souches O inagglutinables, riches en antigène Vi, a été étudiée avec les souches Ty2, T 556 et la souche V, obtenue par dissociation d'une souche VW (T 415). C'est avec la souche T 556 que nous avons surtout travaillé.

La souche T 556 est une souche isolée à partir d'une hémoculture en novembre 1949. Depuis, elle est gardée dans la collection des souches du Centre des Salmonelles de l'Institut Pasteur, sur gélose de Felix.

TABLEAU I. — **Souches W.**

| SOUCHE O 901 | | | SOUCHE T 50-5 | | |
|---------------------------------|--------------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|
| Nombre de germes inoculés | T. C. (1) morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants |
| 2 | 1 | 9 | 2 | 1 | 10 |
| 20 | 4 | 4 | 20 | 4 | 5 |
| 200 | 9 | 1 | 200 | 9 | 2 |
| 2 000 | 13 | 0 | 2 000 | 14 | 1 |
| | | | 20 000. . . . | 20 | 0 |
| L50 = 20 germes. | | | L50 = 27 germes. | | |
| (1) T.C., totaux cumulatifs. | | | | | |

Les résultats de l'appréciation du pouvoir pathogène de ces souches sur l'embryon de poulet de 11 jours sont mentionnés dans le tableau II.

TABLEAU II. — **Souches V.**

| SOUCHE Ty ² | | | SOUCHE T 556 | | |
|---------------------------------|--------------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|
| Nombre de germes inoculés | T. C. (1) morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants |
| 2 | 0 | 11 | 2 | 5 | 11 |
| 20 | 4 | 5 | 20 | 15 | 4 |
| 200 | 8 | 3 | 2 000 | 37 | 0 |
| 2 000 | 14 | 1 | 20 000. . . . | 49 | 0 |
| L50 = 30 germes. | | | L50 = 4 germes. | | |

(1) T. C., totaux cumulatifs.

La souche en forme VW, qui nous a servi pour la dissociation des colonies en forme V et W, a été éprouvée dans sa forme originelle sur l'embryon de poulet. Voici les résultats obtenus avec la souche en formes VW, V et W (Voir tableau III).

Le pouvoir pathogène d'une souche VW et de ses variantes V et W est pratiquement le même.

EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE DES ŒUFS MORTS ET VIVANTS. — Nous avons dit que nous ensemençons le liquide allantoïde de presque

TABLEAU III.

| SOUCHE T 415 VW | | | SOUCHE T 415 V | | | SOUCHE T 415 W | | |
|------------------------------------|----------|---------|------------------------------------|-------|---------|------------------------------------|-------|---------|
| Nombre de germes inoculés | T.C. (1) | | Nombre de germes inoculés | T.C. | | Nombre de germes inoculés | T.C. | |
| | morts | vivants | | morts | vivants | | morts | vivants |
| 2 . . . | 3 | 4 | 2 . . . | 6 | 7 | 2 . . . | 4 | 4 |
| 20 . . . | 8 | 4 | 20 . . . | 15 | 2 | 20 . . . | 8 | 2 |
| 200 . . . | 14 | 0 | 200 . . . | 21 | 0 | 200 . . . | 14 | 0 |
| 2 000 . . | 20 | 0 | 2 000 . . | 27 | 0 | 2 000 . . | 20 | 0 |
| L50 correspond à 9 germes. | | | L50 correspond à 3 germes. | | | L50 correspond à 2 germes. | | |
| (1) T.C., totaux cumulatifs. | | | | | | | | |

tous les œufs morts. Cette culture nous sert à éliminer les contaminations accidentelles.

Si l'on fait une préparation sur lame avec une anse de liquide allantoïde à partir des œufs morts, l'examen microscopique d'une telle lame nous montre une culture abondante de bacille typhique, même dans les cas où nous n'avons inoculé que 2 germes (0,1 cm³ d'une suspension à 20 germes au centimètre cube).

L'examen microscopique du même liquide prélevé sur des œufs restés vivants ne montre que quelques rares bacilles typhiques. Etant donné que dans les cas où le bacille typhique tue l'embryon de poulet, il y a multiplication intense du germe, nous pensons pouvoir en déduire que tout sérum qui inhibera cette multiplication aura avant tout une action « anti-virulence » pour ce germe.

EXAMEN SÉROLOGIQUE DES SOUCHES ISOLÉES À PARTIR DES OEUFS MORTS. — L'examen sérologique des souches isolées montre qu'il n'y a pas de modification antigénique des souches après passage sur l'œuf. Les souches W restent bien dans la forme W, les souches V gardent l'antigène Vi et restent O inagglutinables. La virulence ne paraît pas être augmentée, c'est-à-dire que le nombre de germes nécessaire pour tuer l'embryon reste le même, que l'on utilise la souche originelle ou la souche passée sur l'œuf.

CONCLUSIONS.

Ces résultats nous montrent que l'embryon de poulet est sensible aux souches de bacille d'Eberth, que celles-ci soient en

forme V, W ou VW. L'ensemencement de prélèvements sur les œufs morts indique que c'est bien le bacille typhique qui est la cause de la mort de l'embryon. L'examen des préparations faites avec le liquide allantoïde semble permettre la conclusion que le bacille typhique agit dans ce test par sa virulence, et qu'on peut ainsi évaluer le pouvoir protecteur anti-virulence d'un sérum.

II. — POUVOIR PROTECTEUR DES SÉRUMS DE LAPINS HYPERIMMUNISÉS.

Avec la technique précédemment décrite, nous avons abordé l'étude de différents sérums de lapins hyperimmunisés par le bacille d'Eberth ou d'autres Salmonelles possédant un antigène commun avec ce bacille. Les sérums de lapins ou d'hommes n'ayant jamais été en contact avec *S. typhi* n'ont montré qu'un pouvoir protecteur nul ou tout à fait négligeable sur l'embryon de poulet.

Le passage de *S. typhi* ou des Salmonelles en général, vivantes dans le cas de maladie ou tuées dans le cas de vaccination, dans un organisme animal, est décelable par les agglutinines circulantes du sérum. Ces agglutinines correspondent aux antigènes de la souche en cause et ont des taux très différents. Mais la présence de ces agglutinines circulantes n'implique pas nécessairement la présence d'anticorps protecteurs. On connaît le cas d'anciens typhoïdiques qui perdent les agglutinines circulantes de leur sérum quelques mois après la fin de la maladie, et qui néanmoins restent immunisés contre une infection ultérieure à *S. typhi*. Par contre, le cas d'infection de personnes vaccinées contre des Salmonelles, et conservant des agglutinines circulantes dans leur sérum, est aussi connu. Donc, les agglutinines doivent être considérées uniquement comme la réponse décelable d'un animal à des bactéries introduites, vivantes ou tuées, dans son organisme.

D'après les travaux récents sur l'immunité acquise par la vaccination antityphoïdique, un vaccin est considéré comme bon s'il provoque l'apparition des agglutinines O et Vi dans le sérum du vacciné. Mais les titres de ces deux agglutinines sont très bas, surtout le titre des agglutinines Vi, qui dépasse rarement 1 : 20. C'est pour cette raison que, avant d'aborder l'étude des sérums des vaccinés, nous nous sommes tournées vers l'étude des sérums de lapins hyperimmunisés.

La différence entre le sérum d'un animal hyperimmunisé et celui d'un vacciné est dans le mode d'immunisation. Les animaux hyperimmunisés reçoivent par voie intraveineuse de grandes quantités d'antigène, parfois tué, mais le plus souvent vivant, à intervalles de quatre jours, ce qui favorise la produc-

tion des agglutinines. Par contre, toutes les vaccinations sont effectuées par voie sous-cutanée, à des intervalles d'une semaine au moins. Les titres des agglutinines circulantes sont de beaucoup inférieurs à ceux des animaux hyperimmunisés. En abordant l'étude des sérums des animaux hyperimmunisés présentant des agglutinines O et Vi, nous avons admis qu'ils sont en même temps des porteurs d'anticorps protecteurs éventuels. En effet, ces sérums étant préparés avec des souches aux antigènes déterminés, l'étude des taux d'agglutination correspondante et du pouvoir protecteur était susceptible de nous montrer s'il y avait parallélisme entre agglutinines et anticorps protecteurs.

Les sérums d'animaux hyperimmunisés que nous avons utilisés ont été préparés au Centre des Salmonelles de l'Institut Pasteur. La plupart de ces sérums datent de plusieurs mois et sont conservés à la glacière à une température de 4° C. Les titres d'agglutinines vérifiés au moment de l'emploi dans les tests de séro-protection n'ont pratiquement pas changé depuis la saignée des lapins chargés. L'addition de sérum frais de lapin ou de cobaye ne change pas leur activité protectrice.

POUVOIR PROTECTEUR DES SÉRUMS DE LAPINS HYPERIMMUNISÉS AUX AGGLUTININES O VIS-A-VIS DES SOUCHES V, W. — *Sérum.* — Le sérum T 50-5 a été préparé à partir de la souche T 50-5. Cette souche ne contient pas d'antigène Vi, et le sérum du lapin inoculé avec cette souche chauffée deux heures à 100° a montré la présence des agglutinines O correspondant à un titre 1/12 800 et des agglutinines II au titre 1/800. Pas d'agglutinines Vi au titrage en tube.

Suspensions microbiennes. — Le sérum T 50-5 a été testé vis-à-vis de la souche T 50-5, de la souche T 50-45 et de la souche T 415 (O), toutes des souches W, d'une part, et vis-à-vis de la souche T 556 et de la souche T 415 (Vi), souches O inagglutinables considérées comme souches V, d'autre part. Les résultats de ces épreuves sont donnés dans le tableau IV.

Les œufs témoins inoculés avec les mêmes suspensions ont tous eu la dose L 50 entre 2 et 20 germes.

De ce tableau, on peut conclure qu'un sérum de lapin hyperimmunisé au titre O = 1/12 800 protège l'embryon de poulet contre une infection avec des souches en forme W et ne protège pratiquement pas contre une infection avec des souches en forme V.

POUVOIR PROTECTEUR DES SÉRUMS DE LAPINS HYPERIMMUNISÉS POSSÉDANT LES AGGLUTININES Vi + O ET Vi, VIS-A-VIS DES SOUCHES V, W ou VW. — *Sérums.* — Nous n'avons pas de sérums antityphiques Vi purs, c'est-à-dire ne contenant pas simultanément des agglutinines O et Vi. L'injection d'une souche O inaggluti-

TABLEAU IV.

| SOUCHE T 50-5 W | | | T 50-45 W | | | T 415 W | | | T 556 V | | | T 415 V | | |
|-------------------|-------------|---------------|---------------------|-------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|--------------------------------|-------------|---------------|------------------|-------------|---------------|
| Nombre de germes | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes | T. C. morts | T. C. vivants |
| 20 . . . | 4 | 11 | 20 . . . | 3 | 17 | 20 . . . | 2 | 13 | 20 . . . | 4 | 3 | 20 . . . | 3 | 16 |
| 200 . . . | 6 | 9 | 200 . . . | 5 | 13 | 200 . . . | 4 | 9 | 200 . . . | 10 | 1 | 200 . . . | 11 | 7 |
| 2 000 . . | 9 | 3 | 2 000 . . | 7 | 9 | 2 000 . . | 7 | 5 | 2 000 . . | 16 | 1 | 2 000 . . | 21 | 3 |
| 20 000 . | 13 | 2 | 20 000 . | 8 | 5 | 20 000 . | 11 | 2 | 20 000 . | 21 | 1 | 20 000 . | 26 | 1 |
| L50 = 600 germes. | | | L50 = 3 000 germes. | | | L50 = 500 germes. | | | L50 = au-dessous de 20 germes. | | | L50 = 60 germes. | | |

nable à un lapin donne toujours en réponse d'agglutinines un certain titre d'agglutinines O. C'est pour cette raison que nous avons utilisé le sérum obtenu par hyperimmunisation avec *S. ballerup* (sérum K 097). Cette *Salmonella* a en commun avec le bacille d'Eberth, l'antigène Vi. Le titre des agglutinines Vi de notre sérum est de 1/1 600, titré spécifiquement avec un antigène Vi pur. L'agglutination O antityphique est négative aux titres de 1/10 et 1/20.

Suspensions. — Les mêmes que précédemment.

Les résultats du pouvoir protecteur de ce sérum sont donnés dans le tableau V.

TABLEAU V.

| SOUCHE T 556 V | | | SOUCHE T 415 V | | | SOUCHE T 50-5 W | | | SOUCHE T 415 W | | |
|---------------------------|-------------|---------------|---------------------------|-------------|---------------|---------------------------|-------------|---------------|---------------------------|-------------|---------------|
| Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants |
| 20 . . . | 4 | 4 | 20 . . . | 5 | 15 | 20 . . . | 6 | 20 | 20 . . . | 12 | 3 |
| 200 . . . | 8 | 2 | 200 . . . | 11 | 8 | 200 . . . | 11 | 14 | 200 . . . | 22 | 3 |
| 2 000 . . | 14 | 0 | 2 000 . . | 20 | 2 | 2 000 . . | 19 | 7 | 2 000 . . | 23 | 1 |
| 20 000 . | 20 | 0 | 20 000 . | 26 | 0 | 20 000 . | 28 | 3 | 20 000 . | 45 | 0 |
| L50 = 20 germes. | | | L50 = 60 germes. | | | L50 = 650 germes. | | | Pas de protection. | | |

Les œufs témoins inoculés avec les mêmes suspensions ont tous eu la dose L 50 entre 2 et 20 germes.

Les résultats du tableau V sont tels qu'il nous est difficile d'en tirer une conclusion. Si nous avons utilisé un sérum préparé avec *S. ballerup*, c'était pour avoir un sérum Vi pur du point de vue de *S. typhi*. Mais il se peut, comme l'affirme dans une étude Bilaudelle [9], que l'antigène Vi de *S. ballerup* soit seulement apparenté à l'antigène Vi du bacille typhique, sans lui être identique. Dans ce cas, les réactions immunologiques de ces deux antigènes peuvent être différentes, ce qui expliquerait la faible protection du sérum anti-Vi Ballerup à une infection à *S. typhi*.

Le sérum K 049 a été préparé avec la souche T 556. Les titres de ce sérum sont : agglutination vis-à-vis de la suspension Eberth O, 1/12 800, vis-à-vis de la suspension Vi 1/3 200. Les résultats des épreuves faites sur l'embryon de poulet avec ce sérum et les suspensions des souches en forme W (T 50-5, T 50-45, T 415 W) et des formes V (T 556, T 415 Vi) sont donnés dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

| T 50-5 W | | | T 50-45 W | | | T 415-W | | | T 556 V | | | T 415 V | | |
|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|
| Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants |
| 20. . . | 0 | 21 | 20. . . | 2 | 20 | 20. . . | 2 | 13 | 2. . . | 0 | 27 | 20. . . | 1 | 12 |
| 200 . . | 0 | 15 | 200 . . | 3 | 15 | 200 . . | 6 | 9 | 20. . . | 5 | 21 | 200 . . | 2 | 7 |
| 2 000 . | 0 | 9 | 2 000 . | 4 | 10 | 2 000 . | 8 | 7 | 200 . . | 10 | 14 | 2 000 . | 5 | 2 |
| 20 000. | 4 | 3 | 20 000. | 5 | 5 | 20 000. | 9 | 4 | 2 000 . | 18 | 17 | 20 000. | 9 | 0 |
| | | | | | | | | | 20 000. | 21 | 3 | | | |
| L50 = 16 000 germes. | | | L50 = 20 000 germes | | | L50 = 3 500 germes. | | | L50 = 370 germes. | | | L50 = 450 germes. | | |

Les œufs témoins ont eu la dose L 50 entre 2 et 20 germes.

Voici les résultats d'un autre sérum O Vi préparé avec la souche Ty2. Les titres de ce sérum sont O = 1/3 200, Vi = 1/1 600. Les suspensions utilisées sont les mêmes que celles du tableau précédent (voir tableau VII).

Si on compare les résultats de ces tableaux avec ceux du tableau IV, sérum O pur, on voit que la protection évaluée en nombre de germes inoculés est supérieure dans le cas de sérum O-Vi pour les souches en forme V. Il semble que le sérum d'un lapin, injecté avec des souches O inagglutinables (T 556, Ty2) contienne des anticorps protecteurs à la fois contre une infection à bacille d'Eberth en forme V et en forme W. La souche d'épreuve la plus pathogène pour l'œuf, dans nos expé-

TABLEAU VII.

| T 50-5 W | | | T 415 W | | | T 415 V | | | T 556 V | | |
|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|----------------|------------------|
| Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants | Nombre de germes inoculés | T. C. morts | T. C. vivants |
| 20. . . | 2 | 13 | 20. . . | 1 | 14 | 20. . . | 1 | 10 | 20. . . | 2 | 10 |
| 200 . . | 3 | 9 | 200 . . | 1 | 9 | 200 . . | 3 | 5 | 200 . . | 5 | 6 |
| 2 000 . | 5 | 4 | 2 000 . | 3 | 3 | 2 000 . | 7 | 1 | 2 000 . | 9 | 3 |
| 20 000 | 8 | 1 | 20 000. | 7 | 0 | 20 000. | 12 | 0 | 20 000. | 13 | 1 |
| L50 = 400 germes. | | | L50 = 2 000 germes. | | | L50 = 500 germes. | | | L50 = 70 germes. | | |

riences, est la souche T 556. Il est intéressant de noter, d'autre part, que les souches dissociées en forme V et W d'une souche VW (T 415) ne se comportent pas comme des souches V pur ou W pur du point de vue de leur pouvoir pathogène. Ce fait peut être dû à ce que les souches dissociées gardent le pouvoir pathogène de la souche initiale (voir tableau III de la première partie), sans rapport avec les antigènes présents. Disons encore une fois qu'une souche dissociée, inoculée à l'œuf et isolée à partir de l'œuf mort ou vivant, garde les antigènes de la forme dissociée. Ainsi, nous n'obtenons jamais la transformation de la mutante W ou V en VW.

Quant à l'existence d'un parallélisme entre agglutinines et anti-corps protecteurs, nos expériences nous permettent de dire que les sérums contenant des agglutinines circulantes ont un certain pouvoir protecteur. Notons toutefois que les sérums qui contiennent des agglutinines O + Vi ont un pouvoir protecteur supérieur à celui des sérums ne contenant que des agglutinines O. Ce fait est intéressant à souligner surtout dans le cas des sérums T 50-5 et T 556, sérums qui ont le même titre d'agglutinines O. Les deux souches T 50-5 et T 556 ont été isolées à partir de malades, dans les formes W et V, respectivement. Précisons que ces considérations ne sont valables que pour des sérums d'animaux hyperimmunisés. Les sérums des malades et des vaccinés feront l'objet d'un travail ultérieur.

En résumé, les expériences faites avec des sérums de lapins hyperimmunisés contenant des agglutinines O, O-Vi de *S. typhi* et Vi de *S. ballerup* montrent :

1° Que les souches W donnent des sérums contenant des anti-corps protecteurs contre une infection à *S. typhi* en forme W, tandis que le pouvoir protecteur est nul ou minime contre une infection à *S. typhi* en forme V.

2° Les souches en forme V donnent des sérums contenant des agglutinines O + Vi et leur pouvoir protecteur est bon contre des infections à *S. typhi* en forme V et W. Les expériences faites avec un sérum anti-*S. ballerup* Vi ne nous permettent pas de conclure à une action protectrice des anticorps Vi supérieure à celle des anticorps O. Mais il est possible que l'antigène Vi de *S. ballerup*, et par conséquent l'anticorps Vi Ballerup, ne soit pas identique, au point de vue immunologique, à celui de *S. typhi*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BONNEFOI et M^{me} J. GRABAR. *Ces Annales*, 1947, **73**, 259.
- [2] H. C. BATSON. *J. exp. Méd.*, 1949, **90**, 233.
- [3] A. J. WEIL et L. S. GALL. *J. Immunol.*, 1941, **41**, 445.
- [4] W. I. B. BEVERIDGE et E. M. BURNET. *Culture des virus et rickettsies dans l'embryon du poulet*. Edit. Flammarion, Paris.
- [5] C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Les ultravirus des maladies humaines*. Edit. Maloine, Paris, 1948, 1667.
- [6] BAUMANN et WITEBSKY. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **416**, 10 ; *ces Annales*, 1934, **53**, 282.
- [7] A. J. WEIL et Mc FARLANE. *J. Immunol.*, 1944, **148**, 291.
- [8] L. S. REED et H. MUENCH. *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [9] H. BILAUDELLE. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1950, **108**, 119.

**TRAITEMENT DE LA BRUCELLOSE (*BR. MELITENSIS*)
EXPÉRIMENTALE DU COBAYE PAR LE BAL
(2, 3 DIMERCAPTOPROPANOL OU DITHIOGLYCÉROL)
SEUL OU ASSOCIÉ
AU CHLORAMPHÉNICOL OU A L'AURÉOMYCINE (*)**

par G. RENOUX (**).

(Centre OMS/OAA de Recherches sur la Fièvre ondulante,
Montpellier.)

Nous avons montré, dans des publications antérieures, que le BAL inhibait la croissance des *Brucella* « *in vitro* » et que ce produit, dans les mêmes conditions, augmentait l'action antibiotique du chloramphénicol, de l'auréomycine, de la dihydrostreptomycine, de la terramycine vis-à-vis des mêmes bactéries [1, 3].

Une expérience sur quelques souris a également donné des résultats favorables [2].

Ce sont les résultats des essais sur le cobaye que nous rapportons ici.

I. ACTION DU BAL SEUL OU ASSOCIÉ AU CHLORAMPHÉNICOL. —
Première expérience (tableau I). — 20 cobayes sont infectés par l'application de 1 million de cellules (*Br. melitensis*) sur la peau scarifiée de l'abdomen. Ils sont ensuite répartis en 2 groupes : l'un est traité pendant six jours, six jours après l'infection ; l'autre pendant treize jours, dix-neuf jours après l'infection. Dans chaque groupe, 2 cobayes non traités servent de contrôle (ce mode d'inoculation et cette dose de corps microbiens n'ont jamais failli à infecter nos animaux d'expérience au cours de milliers d'essais).

Dans chaque groupe, 2 lots :

(*) Qu'il nous soit permis de remercier très vivement M. H. Quatre-fages et tout le personnel du Centre de Recherches pour leur aide technique inestimable.

(**) *Société française de Microbiologie*, séance du 10 mai 1951.

TABLEAU I. — Traitement de la brucellose du cobaye par le BAL ou l'association BAL-chloramphénicol (Première expérience.)

| NUMÉROS des cobayes | CULTURES | | | | | INFECTÉS |
|---|----------|------|------|-----------|---------------------|----------|
| | Sang | Rate | Foie | Ganglions | Organes génitaux | |
| PREMIER GROUPE. (Traitement commencé 6 jours après l'infection. Durée du traitement, 6 jours.) | | | | | | |
| <i>BAL seul.</i> | | | | | | |
| 295. | + | + | + | — | | 4/4 |
| 296. | + | + | — | — | | |
| 299. | + | + | + | + | | |
| 300. | + | + | + | + | | |
| <i>BAL + chloro.</i> | | | | | | |
| 297. | + | + | — | + | | 2/4 |
| 298. | — | — | — | — | | |
| 301. | — | — | — | — | | |
| 302. | + | + | + | + | | |
| <i>Contrôles.</i> | | | | | | |
| 294. | + | + | + | — | | 2/2 |
| 303. | + | + | + | + | | |
| DEUXIÈME GROUPE. (Traitement de 13 jours commencé 19 jours après l'infection.) | | | | | | |
| <i>BAL seul.</i> | | | | | | |
| 304. | — | — | — | — | Placenta + (1). | 4/4 |
| 305. | — | — | — | — | | |
| 306. | — | — | — | — | | |
| 307. | — | — | — | — | | |
| <i>BAL + chloro.</i> | | | | | | |
| 308. | — | +(1) | — | — | | 2/4 |
| 309. | — | — | — | — | | |
| 310. | — | — | — | — | — | |
| 311. | — | + | + | — | | |
| <i>Contrôles.</i> | | | | | | |
| 312. | + | + | + | + | | 2/2 |
| 313. | — | + | + | + | | |
| (1) Une colonie seulement. | | | | | | |

(1) Une colonie seulement.

1° Traitement par le BAL seul : 10 mg par jour en une injection intramusculaire ;

2° Traitement par l'association BAL intramusculaire + 20 mg par jour de chloramphénicol en deux injections intrapéritonéales.

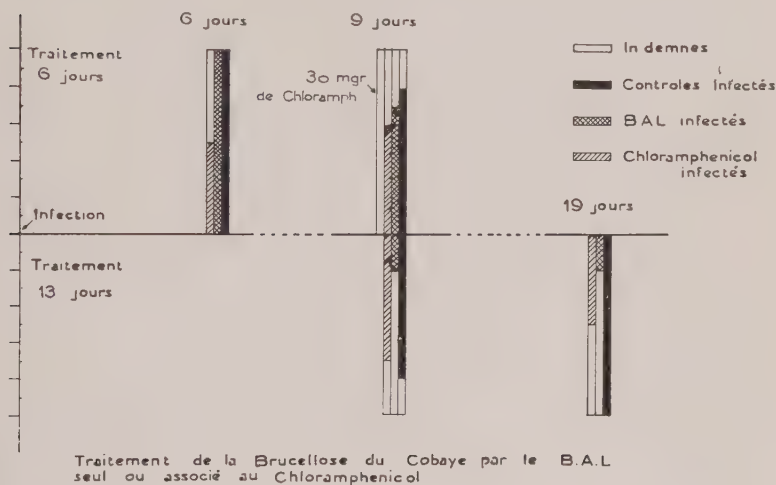
Tous les cobayes sont sacrifiés deux jours après l'arrêt du traitement, en même temps que les contrôles correspondants, soit :

Quinze jours après l'infection pour le premier groupe ;
Trente-quatre jours pour le second.

Les lésions macroscopiques ont été soigneusement notées et les organes et le sang du cœur (prélevé avant la mort) ensemencés sur bacto-tryptose-agar d'un lot vérifié. Disons tout de suite qu'en aucun cas, un cobaye présentant des lésions macroscopiques typiques n'a donné de cultures négatives. Les ensemencements ont été conservés un mois à l'étuve à 37°.

D'après cet essai, qui n'a que la valeur d'une expérience d'orientation, on voit que :

Six jours de traitement par le dithioglycérol (BAL) ne suffisent



pas, même au début de la brucellose expérimentale, alors qu'il ne s'agit que de la phase septicémique de la maladie ; le même traitement prolongé treize jours protège complètement 3 cobayes sur 4. L'association du BAL et du chloramphénicol donne des résultats identiques, que le traitement dure six ou treize jours : 1 animal sur 2 est indemne de brucellose.

Deuxième expérience (tableau II). — Soixante-quatre cobayes (35 mâles et 29 femelles) de poids compris entre 450 et 500 g sont infectés par injection sous-cutanée de 1 ml d'une suspension de *Br. melitensis* (H. 105) « smooth » contenant 1 000 cellules à la numération par comparaison néphélométrique avec un étalon standard ; cette suspension a donné 650 colonies par millilitre après ensemencement sur bacto-tryptose-agar (moyenne de 3 numérations).

TABLEAU II. — **Traitement de la brucellose du cobaye par le BAL ou l'association BAL-chloramphénicol** (Deuxième expérience.)

| LOTS | RÉSULTAT DES CULTURES | | | | INFECTÉS |
|---|-----------------------|------|------|----------|------------|
| | Sang | Rate | Foie | Ganglion | |
| I. BAL seul, 6 jours. | | | | | |
| 332, 333. | — | — | — | — | 3/10 |
| 334. | — | — | — | + | |
| 335. | — | +(1) | — | — | |
| 336. | — | + | + | + | |
| 337, 338, 339, 340, 341. | — | — | — | — | |
| II. BAL + chloro. 20 000, 6 jours. | | | | | |
| 362, 364, 368, 371. | — | — | — | — | 6/10 |
| 363. | + | + | — | — | |
| 365. | + | + | + | + | |
| 366. | — | + | +(1) | — | |
| 367, 370. | + | + | + | — | |
| 369. | + | — | — | — | |
| III. BAL + chloro. 30 000, 6 jours. | | | | | |
| 352 à 361. | — | — | — | — | 0/10 |
| IV. BAL seul, 13 jours. | | | | | |
| 342, 343, 345, 344, 347, 349, 350, 351. | — | — | — | — | 2/10 |
| 346. | — | — | — | + | |
| 348. | — | — | +(1) | — | |
| V. BAL + chloro. 20 000, 13 jours. | | | | | |
| 372, 375, 381. | — | — | — | — | 7/10 |
| 373, 377, 378, 380. | + | + | + | + | |
| 374, 379. | — | + | — | — | |
| 376. | + | + | + | — | |
| VI. Contrôles. | | | | | |
| a) De I, II, III. | | | | | |
| 317. | — | — | — | — | 5/6 |
| 318, 319, 320. | — | + | — | — | |
| 321. | + | — | + | — | |
| 322. | — | — | + | + | |
| b) De IV et V. | | | | | |
| 327, 330. | — | — | — | — | Pas ensem. |
| 324, 328. | — | — | + | — | |
| 323, 326. | — | + | + | — | |
| 325, 329. | + | + | + | — | |
| (1) Une seule colonie. | | | | | |

(1) Une seule colonie.

Au bout de neuf jours, ces animaux sont répartis en 6 lots :

Lot I : 10 cobayes sont traités pendant six jours par une injection intramusculaire quotidienne de 10 000 microgrammes de BAL.

Lot II : 10 cobayes reçoivent quotidiennement 10 000 microgrammes de BAL en une injection intramusculaire et 20 000 micro-

grammes de chloramphénicol en deux injections intrapéritonéales, pendant six jours.

Lot III : 10 cobayes reçoivent pendant six jours la même dose, par la même voie, de BAL et 30 000 microgrammes de chloramphénicol.

Lot IV : même traitement que pour le lot II, mais prolongé treize jours (10 cobayes).

Lot V : même traitement que pour le lot III, pendant treize jours (10 cobayes).

Lot VI : cobayes de contrôle de l'infection, non traités (14 cobayes).

Quatre jours après la fin des traitements, soit dix-neuf jours après l'infection pour les animaux des lots I, II, III (en même temps que 6 cobayes de contrôle) ou vingt-six jours pour les lots IV, V et le reste des contrôles, nous avons sacrifié ces animaux par éthérisation, fait les nécropsies, noté les lésions macroscopiques et ensemencé sur bacto-tryptose-agar les organes prélevés et le sang du cœur. Comme dans la première expérience, aucun des animaux présentant des lésions macroscopiques n'a failli à donner des cultures positives.

Les résultats des ensemencements, conservés un mois à l'étuve à 37°, sont résumés dans le tableau II.

Aucun des cobayes des séries IV et V n'a présenté de lésions macroscopiques à l'examen des viscères.

On peut schématiser ainsi les résultats de cette expérience :

a) Traitement commencé neuf jours après infection et poursuivi pendant six jours :

L'infection, telle que nous l'avons pratiquée, ne s'est objectivée que sur 5 sur 6 cobayes de contrôle.

Dans ces conditions, le BAL seul a protégé une partie des cobayes traités : en effet, nous n'avons que 3 animaux sur 10 d'infectés (encore l'un d'eux l'était très légèrement puisqu'il n'a donné qu'une seule colonie de *Brucella* après ensemencement de ses viscères).

La même dose de BAL associée à 20 000 microgrammes par jour de chloramphénicol s'est montrée pratiquement sans action sur l'évolution de la Brucellose du cobaye, la proportion d'infectés étant la même que dans le groupe de contrôle.

Cette dose de BAL, mais avec 30 000 microgrammes par jour de chloramphénicol, a protégé tous les animaux de ce lot (lot III) qui n'ont présenté ni lésions, ni *Brucella* dans les cultures.

b) Traitement commencé neuf jours après l'infection et poursuivi pendant treize jours :

L'infection ne s'est objectivée que sur 6 sur 8 des cobayes de

contrôle dont malheureusement nous n'avons pas ensemencé les ganglions.

Dans ces conditions, le BAL seul a protégé sûrement la plupart des animaux : 2 sur 10 ont donné une culture positive, aucun ne présentait de lésions, alors que 8 au moins auraient dû être infectés.

L'association de 20 000 microgrammes par jour de chloramphénicol à la même dose de BAL que ci-dessus n'a protégé, ou guéri, aucun animal, la proportion d'infectés étant à peu près la même que dans le groupe de contrôle.

DISCUSSION. — C'est volontairement que nous n'avons pas essayé l'action du chloramphénicol seul sur l'évolution de la Brucellose expérimentale du cobaye ; en effet, tous les auteurs qui ont étudié cet antibiotique chez le cobaye ont échoué dans leurs tentatives de cure, encore s'agissait-il d'infection à *Br. abortus*, bacille généralement moins virulent que *Br. melitensis* : tout au plus ont-ils noté une diminution du nombre de colonies, par rapport aux témoins, après mise en culture des viscères [4, 5].

D'autre part, nous n'avons recherché qu'une réponse par oui ou par non : présence ou absence de *Brucella* dans les cultures. Nous pensons que le compte des colonies et la constatation d'une variation dans leur nombre ne peut suffire pour affirmer la valeur d'un traitement : on ne peut, croyons-nous, parler de guérison ou de protection qu'après constatation de la stérilité bactériologique.

Les résultats que nous venons de rapporter appellent quelques remarques :

1° L'action en apparence paradoxale de la synergie BAL-chloramphénicol :

Que ce soit en six jours ou en treize jours de traitement, l'adjonction de 20 mg de chloramphénicol à 10 mg de BAL ne protège ou ne guérit pas le cobaye, alors que le BAL seul a une action remarquable, surtout si le traitement dure treize jours.

Cependant, si la dose de chloramphénicol est portée à 30 mg par jour, une cure de six jours suffit à guérir tous les animaux en expérience.

Nous pensons qu'il faut rapprocher ce fait de ce que nous avons constaté dans nos essais *in vitro* [4] : une dose de 1 microgramme de dimercaptopropanol par millilitre de milieu de culture augmente considérablement le pouvoir antibiotique du chloramphénicol, mais quand la dose de BAL est portée à 2 µg/ml l'action synergique est bien moins nette. Il semble bien que cette association ne soit active qu'en certaines proportions.

2° Le 2, 3 dimercaptopropanol ou BAL, utilisé seul, possède

« *in vitro* » une activité bactériostatique nette contre les « *Brucella* ». Ce pouvoir se retrouve « *in vivo* » spécialement si le traitement est prolongé treize jours : 3 cobayes sur 4 sont protégés dans la première expérience, 8 sur 10 dans la seconde.

C'est, à notre connaissance, la première expérience où un agent chimique réussit, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, à protéger des animaux contre l'infection brucellique.

II. ACTION DE L'AURÉOMYCINE ASSOCIÉE AU BAL. — Trente cobayes d'un poids moyen de 450 à 500 g ont été infectés de la même manière et le même jour que les cobayes de l'expérience ci-dessus.

Neuf jours après cette inoculation, ils ont été répartis en 3 lots :

VII : traitement de six jours par 10 mg par jour de BAL + 20 mg d'auréomycine en suspension dans l'eau salée ; BAL intramusculaire, auréomycine intrapéritonéale.

VIII : mêmes doses, mais prolongées treize jours.

IX : même dose de BAL associée à 30 mg d'auréomycine.

L'auréomycine était injectée sous forme de suspension, et non de solution : cette suspension était maintenue aussi homogène que possible par agitation.

Quelle que soit la série, quel que soit le traitement, tous ces cobayes ont montré un amaigrissement rapide : 10 d'entre eux, pris au hasard, pesés après six jours, avaient perdu en moyenne le 1/10 de leur poids.

En même temps ces animaux mouraient spontanément, sauf 8 que nous avons sacrifiés entre le septième et le neuvième jour, dans des délais variant entre trois et quatorze jours après le début de leur traitement (temps moyen : sept jours).

Pour tous, les constatations anatomiques ont été les mêmes : amaigrissement considérable, avec disparition de toute graisse ; congestion vasculaire, particulièrement intense sur les vaisseaux péritonéaux ; pas de lésions spécifiques de la Brucellose ; présence de nombreux amas d'auréomycine non résorbée dans le péritoine.

Pour tous ces cobayes — sauf un — les cultures des viscères ont donné le même résultat : développement extrêmement abondant d'un bacille à Gram négatif, identifié comme étant un *B. proteus*.

Nous avons pu faire, à un certain nombre de cobayes, des hémocultures pendant leur vie : sur 17 prélèvements ainsi pratiqués, 9 ont été positifs : *Proteus*. Caractères de ce bacille : Gram négatif, très mobile ; lactose, maltose, mannite non fermentés, glucose fermenté ; possède une uréase, liquéfie la gélatine ; pas d'indol, donne de l'hydrogène sulfuré : *Proteus mirabilis*.

Cette souche s'est montrée très résistante aux antibiotiques : elle pousse en présence de 500 unités de pénicilline, de 125 de dihydrostreptomycine, de 62 μg de chloramphénicol, de 450 μg de terramycine et de plus de 1 250 μg d'auréomycine.

Ainsi le traitement des cobayes par l'association d'auréomycine et de BAL a abouti à un amaigrissement considérable de ces animaux et à leur mort rapide par cachexie associée à la présence dans le sang et dans les viscères d'un *Proteus mirabilis*.

On sait [4, 6] que l'auréomycine fait considérablement maigrir les cobayes à qui on l'injecte : cet antibiotique n'est pas dépourvu de toute toxicité pour cet animal.

Quel est le rôle du *Proteus* que nous avons isolé : microbe de sortie ou agent pathogène ?

Pour notre part, nous pensons que dans le cas particulier il s'agit d'un microbe vraiment pathogène. En effet, on sait, depuis Giroud et Tannenbaum [7], que les *Proteus* ne sont pas des hôtes habituels des voies digestives des cobayes et qu'il est assez difficile d'implanter ce microbe chez cet animal. Nous avons recherché les *Proteus* dans les selles de 6 cobayes de cette expérience : six fois la culture a été positive, abondamment ; la même recherche faite dans les selles de 10 cobayes normaux ou traités au chloramphénicol s'est toujours révélée négative. D'autre part, nous avons noté [8] que l'association du BAL à l'auréomycine diminuait *in vitro*, dans la plupart des cas, le pouvoir de cet antibiotique vis-à-vis d'un grand nombre de bacilles à Gram négatif. On peut donc penser que sous l'influence du traitement, d'une part la résistance naturelle des cobayes a été considérablement diminuée par la relative toxicité de l'auréomycine pour cet animal ; d'autre part, l'important remaniement de la flore microbienne intestinale a permis le développement exubérant d'un microbe, qui n'est pas un commensal habituel du cobaye et qui a infecté cet animal. Le fait que de nombreuses hémocultures aient été positives pendant la vie de ces cobayes est encore un argument en faveur de cette manière de voir.

RÉSUMÉ. — Essai de traitement de la Brucellose expérimentale à *Br. melitensis* du cobaye par le 2, 3 dimercaptopropanol ou dithioglycérol (BAL) soit seul, soit associé au chloramphénicol ou à l'auréomycine.

Traitement par le BAL seul : six jours de traitement (dose quotidienne, 10 mg en une injection) protègent une partie des cobayes : 7 sur 10 contre une infection qui atteint 5 cobayes sur 6 contrôlés.

Le même traitement, prolongé treize jours, est encore plus efficace puisqu'il protège 8 cobayes sur 10.

Traitement par l'association chloramphénicol-BAL : quelle

que soit la durée du traitement (six ou treize jours), 20 mg de chloramphénicol associés à la même dose que ci-dessus de BAL sont inefficaces.

Au contraire, 30 mg de cet antibiotique faits en même temps que le BAL protègent tous les animaux. Il semble bien (en confirmation des constatations faites *in vitro*) que les proportions relatives de chloramphénicol et de BAL jouent un rôle important : un excès de BAL par rapport à l'antibiotique empêche l'action curative de la synergie.

Traitement par l'association auréomycine-BAL : quelles qu'aient été les doses d'auréomycine injectées en même temps que le BAL, tous les cobayes sont morts rapidement, cachectiques, avec une septicémie à *Proteus mirabilis* (souche très résistante aux divers antibiotiques).

Les résultats favorables obtenus ici dans le traitement de la Brucellose expérimentale du cobaye (Brucellose à *Br. melitensis*) par le BAL seul ou associé à 30 000 microgrammes par jour de chloramphénicol sont, à notre connaissance, les premiers qui aient été observés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. RENOUX et J. ROUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 189-195.
- [2] G. RENOUX et J. ROUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 425.
- [3] G. RENOUX et J. ROUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 680.
- [4] A. I. BRAUDE et W. SPINK. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 185-199.
- [5] A. POMALES-LEBRON et H. E. HALL. *Treatment of experimental « Br. abortus » infection in Guinea pigs and Mice*. Third interamerican Congress on Brucellosis, Washington, 6-10 novembre 1950 (sous presse).
- [6] L. W. HOLM et W. G. MOORE. *Am. J. Vet. Res.*, 1950, **11**, 211-213.
- [7] P. GIROUD et S. TANNENBAUM. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1937, **26**, 671-675.
- [8] G. RENOUX et J. ROUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 633.

EFFET DU BENZOATE ET DU SALICYLATE SUR LA RESPIRATION DES BACILLES TUBERCULEUX VIRULENTS ET AVIRULENTS

par A. ANDREJEW (*).

(Institut Pasteur.
Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

Les travaux de Lehmann, qui ont abouti à la découverte du PAS (acide para-amino-salicylique), une des substances les plus actives contre les bacilles tuberculeux, ont débuté par la recherche d'un corps susceptible d'exercer un effet bactériostatique et d'inhiber ce qu'il appelle « l'effet benzoïque » et « l'effet salicylique ». Ces deux « effets », qui ont été mis en évidence par Bernheim [1], consistent essentiellement en une augmentation de la respiration (Q_{O_2}) des bacilles tuberculeux se trouvant en état de « resting » et mis en présence de l'acide benzoïque ou de l'acide salicylique. Bien que cette voie n'ait pas été suivie par Lehmann pendant longtemps, elle a permis à cet auteur de réaliser quelques études concernant les bacilles tuberculeux virulents et avirulents. C'est ainsi que, d'après Lehmann [2], seuls les bacilles tuberculeux virulents donnent lieu aux « effets » benzoïque et salicylique ; la respiration des bacilles tuberculeux avirulents (BCG ; R ; R) restant totalement inchangée en présence de ces acides.

Devant ces nouvelles perspectives de recherches et ces conclusions de grande importance, il nous a paru utile de revoir et, éventuellement, de compléter certains points de ce problème.

Au cours de ce travail nous avons utilisé, comme bacilles tuberculeux virulents, la souche $H_{37}R_v$, la souche humaine P (résistante à 1 000 US/cm³ de streptomycine) et la souche humaine A (résistante à 30 US/cm³ de streptomycine), ainsi que les souches avirulentes BCG, $H_{37}Ra$, R_1 et une souche bovine très atténuée, Vallée. L'avirulence des souches a été confirmée par inoculation (1 mg) aux cobayes.

L'expérimentation a été effectuée dans les conditions suivantes : après une culture de durée variable sur milieu de Sauton, les

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} mars 1951.

bacilles sont lavés à l'eau distillée et mis en suspension dans une solution tampon-phosphates M/20 (pH = 6,9). En plus de KOH du godet central, on introduit dans la cupule de Warburg : 1 cm³ de suspension microbienne (contenant généralement 5 à 8 mg de bacilles secs), 0,8 cm³ de la solution-tampon et, dans la branche latérale, 0,2 cm³ de benzoate de Na ou d'acide salicylique (Billault) pur ou neutralisé à la soude, dilués et réalisant une concentration finale de 1 mg/cm³. (Les avantages d'une telle concentration ont été préalablement établis par expérience.) Le thermostat de l'appareil est réglé à 37-38°. Le benzoate ou le salicylate n'est mis en contact avec les bacilles que lorsque l'équilibre thermique du système est atteint. Une partie de la suspension microbienne sert à la détermination du poids sec des bacilles.

A. — BACILLES VIRULENTS.

Dans ces conditions, nous avons pu confirmer tout d'abord l'existence de « l'effet benzoïque » et de « l'effet salicylique » pour toutes les souches virulentes étudiées. A cette concentration des substances et dans ces conditions d'expérience, « l'effet benzoïque » était souvent plus prononcé que « l'effet salicylique ».

Comme le montre la figure 1 (H₃₇Rv. de 11 jours), « l'effet benzoïque » et « l'effet salicylique » peuvent exister non seulement dans le cas du métabolisme endogène de ces bacilles (en milieu de famine), mais aussi dans le cas du métabolisme exogène (respiration aux dépens de la glycérine).

Les bacilles de la souche streptomycino-résistante P, dont le développement sur milieu de Sauton était beaucoup plus lent que celui de H₃₇Rv., ne dépassaient pas les limites de la phase logarithmique de croissance au vingt-troisième jour d'incubation. La figure 2 exprime les « effets » benzoïque et salicylique observés avec la souche P.

La souche A, âgée de 19 jours, nous a fourni les résultats résumés par la figure 3.

Les « effets » benzoïque et salicylique sont-ils un trait constant des cultures de bacilles tuberculeux virulents ?

En mesurant, au cours de nos travaux antérieurs, les variations respiratoires des cultures assez âgées de bacilles tuberculeux, dont la respiration de base était encore appréciable, nous avons pu constater, à de multiples reprises, une baisse de la sensibilité avec laquelle la respiration de ces bacilles réagissait aux différentes substances.

Sur ce point, nos expériences avec le benzoate et le salicylate semblent apporter une nouvelle confirmation. A titre d'exemple, nous citerons l'expérience suivante : 2 cultures de H₃₇Rv. (souche-

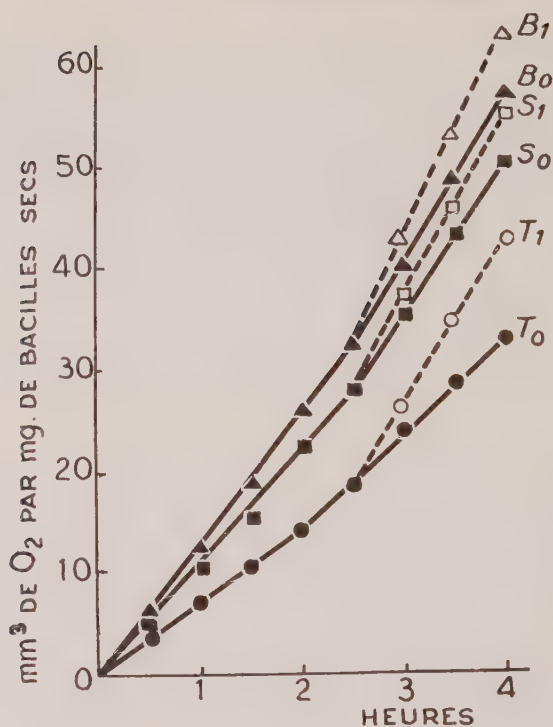


FIG. 1. — Respiration de la souche H₃₇ Rv. T₀, témoin sans glycérine; T₁, témoin avec glycérine; S₀, salicylate sans glycérine; S₁, salicylate avec glycérine; B₀, benzoate sans glycérine; B₁, benzoate avec glycérine.

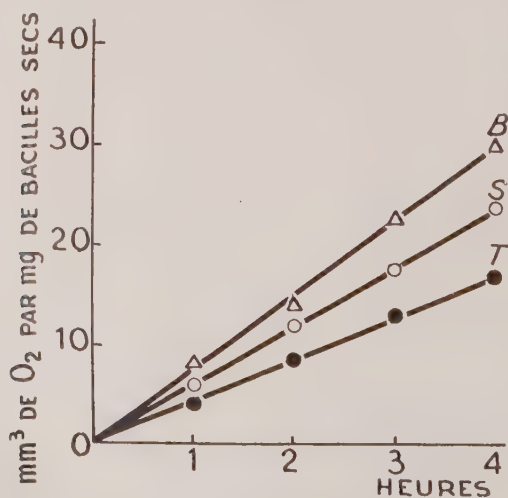


FIG. 2. — Effets du benzoate et du salicylate sur la respiration de la souche P (virulente).

type de bacilles tuberculeux humains de virulence moyenne) de même âge (20 jours sur milieu de Sauton), mais d'une série de repiquages différents, réagissaient (S_1) ou ne réagissaient pas (S_2) aux acides benzoïque et salicylique, suivant la série. La croissance étant plus rapide pour la culture non réagissante S_2 , les cultures S_1 et S_2 , tout en ayant le même âge en jours, présentaient des états physiologiques différents. Au point de vue

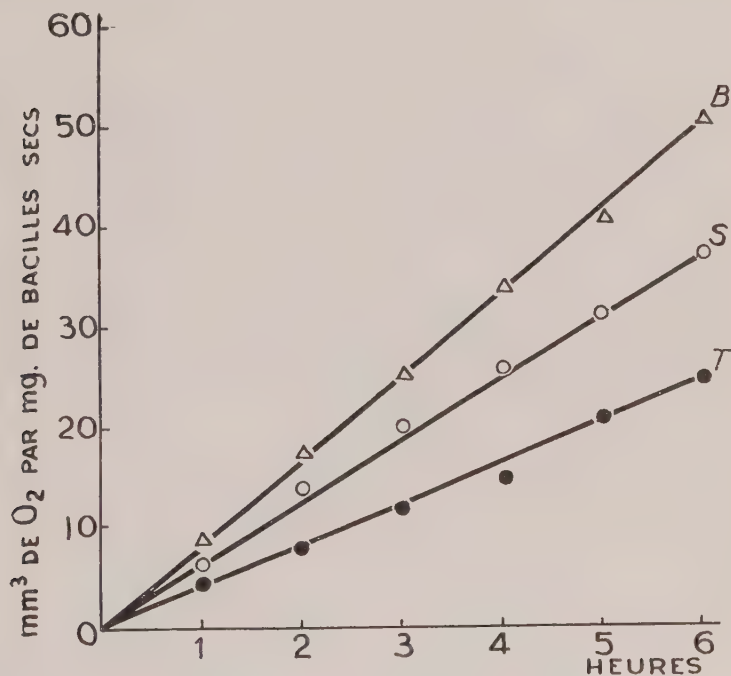


FIG. 3. — Effets du benzoate et du salicylate sur la respiration de la souche A (virulente).

respiratoire, la culture S_1 se comportait d'une façon semblable à celle de la figure 1. Par contre, la culture S_2 consommait en quatre heures près de 16 mm³ de O_2 par milligramme de bacilles secs, aussi bien en présence qu'en l'absence du benzoate ou du salicylate. Après trente jours à 38°, la respiration de la culture S_2 , étant très faible, n'était plus mesurable dans ces conditions d'expérience.

On voit, par conséquent, que même au cours de la culture de bacilles tuberculeux virulents il existe une phase de respiration naturellement abaissée (baisse de 50 p. 100 dans le cas présent), mais non éteinte, qui peut ne pas donner lieu aux « effets »

benzoïque et salicylique. Cette phase commence vers la fin de la phase logarithmique de croissance où la mortalité bacillaire devient de plus en plus importante.

Il est probable que les souches pathogènes HW, H₃, K₂ et surtout les souches avirulentes R₁, R (âgées respectivement de 5, 6, 12, 12 et 16 semaines), que Lehmann a utilisées dans son travail, se trouvaient plus ou moins situées dans cette dernière phase.

B. — BACILLES AVIRULENTS ET ATTÉNUÉS.

Il semble possible d'admettre que l'étude de ces « effets » respiratoires ne peut être valable que dans les limites de la phase exponentielle de croissance. Et puisque cette phase est souvent d'une plus courte durée chez les bacilles tuberculeux avirulents que chez les virulents, il nous a paru nécessaire d'expérimenter sur les cultures avirulentes très jeunes.

Plusieurs expériences effectuées sur le BCG (souche bovine avirulente), âgé de 7, 8, 9 et 10 jours sur milieu de Sauton, nous ont donné des résultats positifs de même nature. A titre d'exemple, nous rapportons dans le tableau I les résultats de trois expériences obtenus avec le BCG âgé de 9 jours et mis en présence du benzoate et du salicylate dans les conditions précédemment décrites et employées.

TABLEAU I. — « Effet benzoïque » et « effet salicylique » du BCG.

| | MILLIMÈTRES CUBES DE O ₂ consommés par milligramme de bacilles secs en heures | | | | | | | | | |
|-------------|---|-----|-------|------|-------|------|-------|-------|------|--|
| | 1 2 | 1 | 1 1/2 | 2 | 2 1/2 | 3 | 3 1/2 | 4 1/2 | 5 | |
| Témoin. | 3,1 | 5,5 | 6,5 | 8,8 | 10,4 | 12,0 | 14,0 | 15,4 | 17,9 | |
| | 3,1 | 5,5 | 6,7 | 8,8 | 10,5 | 12,0 | 13,9 | 16,0 | 18,4 | |
| | 3,5 | 5,7 | 6,7 | 8,8 | 10,8 | 12,8 | 14,9 | 17,1 | 19,8 | |
| Benzoate. | 4,2 | 8,4 | 10,4 | 13,8 | 16,3 | 18,6 | 21,2 | 23,9 | 26,6 | |
| | 4,2 | 7,6 | 9,8 | 12,6 | 14,8 | 17,0 | 19,3 | 21,7 | 24,0 | |
| | 3,9 | 5,8 | 9,9 | 12,9 | 15,4 | 17,6 | 19,8 | 22,9 | 25,1 | |
| Salicylate. | 4,6 | 8,5 | 11,3 | 14,9 | 18,1 | 21,0 | 23,7 | 27,2 | 30,0 | |
| | 4,7 | 9,0 | 11,9 | 15,4 | 18,9 | 21,7 | 24,6 | 28,4 | 31,6 | |
| | 4,8 | 8,7 | 12,0 | 15,5 | 18,4 | 21,6 | 24,4 | 28,1 | 31,2 | |

Il en résulte avec évidence que « l'effet benzoïque » et « l'effet salicylique » peuvent être obtenus avec le BCG.

Une culture de BCG de la même série, mais âgée de 20 jours sur milieu de Sauton, ne réagissait plus du tout au benzoate, ni

au salicylate, tout en conservant une faible respiration résiduelle.

Une culture de BCG d'une autre série (BCG bis) âgée de 30 jours, mais d'une croissance plus lente, consommait en moyenne en trois heures et par milligramme de bacilles secs 0,73, 0,70, 0,66 mm³ de O₂ pour le témoin, le témoin + benzoate et le témoin + salicylate respectivement.

Il est évident, par conséquent, que la respiration du BCG se

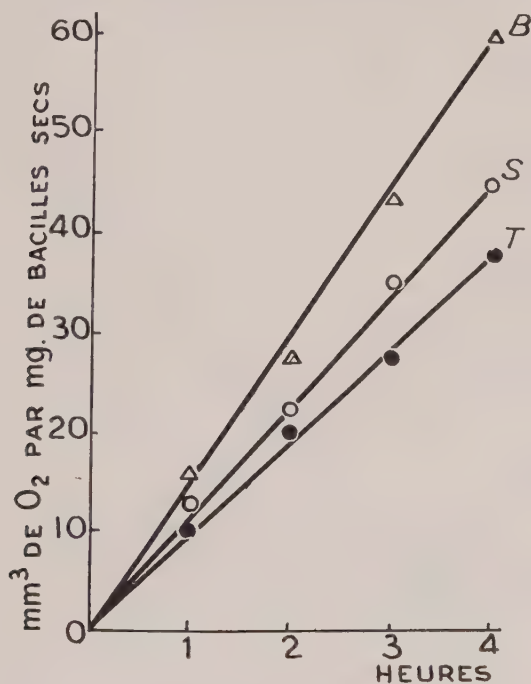


FIG. 4. — Effets du benzoate et du salicylate sur la respiration de la souche H₃₇ Ra (avirulente).

comporte à l'égard du benzoate et du salicylate de façon semblable à celle des bacilles virulents.

Nous avons pu mettre en évidence le même phénomène de présence et de dépendance des « effets » étudiés à l'égard de l'état physiologique de la culture, chez la souche humaine avirulente H₃₇Ra. La croissance de cette souche, tout en étant souvent variable par sa vitesse d'une série à l'autre de ballons, était dans l'ensemble plus lente, au cours de ces expériences, que celle du BCG.

A l'âge de 20 jours H₃₇Ra nous a donné par milligramme de bacilles secs les résultats exprimés par la figure 4. Les

bacilles $H_{37}Ra$, âgés de moins de 20 jours fournissaient des chiffres semblables.

Ces résultats nous permettent de conclure que, même par leur valeur quantitative, les « effets » benzoïque et salicylique des bacilles humains avirulents $H_{37}Ra$ (fig. 4) sont assez semblables à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec les bacilles humains virulents $H_{37}Rv.$ (fig. 1).

Dans les mêmes conditions, la respiration d'une autre culture

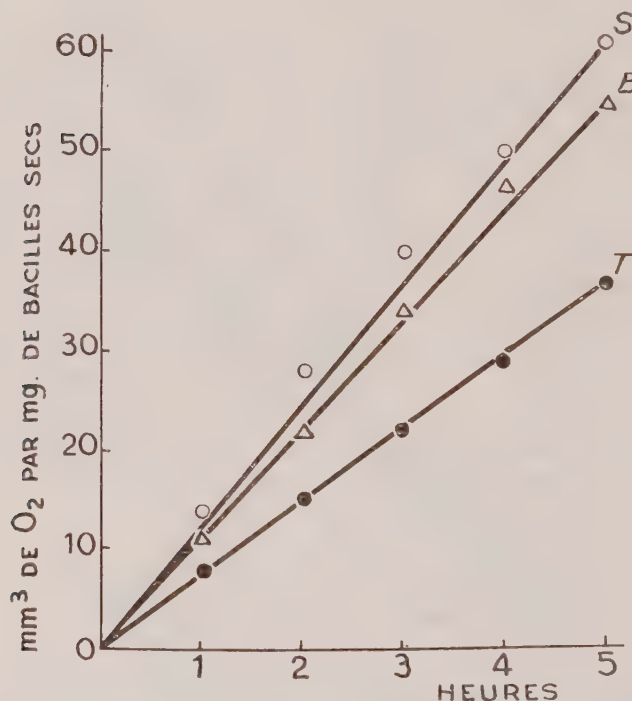


FIG. 5. — Effets du benzoate et du salicylate sur la respiration de la souche R_1 (avirulente).

de $H_{37}Ra$ ($H_{37}Ra$ bis à croissance ralentie), âgée de 20 jours, et présentant un aspect très compact (grosses plaques dures), différent de la première, ne variait pas en présence des acides benzoïque ou salicylique. Après trois heures, la consommation globale d'oxygène en millimètres cubes par milligramme de bacilles secs était de 11,5, 10 et 10,8 pour le témoin, le témoin + salicylate et le témoin + benzoate respectivement.

Ainsi, indépendamment de la virulence, pour cette souche comme pour $H_{37}Rv.$ ou le BCG, l'état physiologique de la

culture semble déterminer la présence ou l'absence des « effets » benzoïque ou salicylique.

Les résultats obtenus avec la souche R_1 (âgée de 15 jours), classée comme avirulente par la Trudeau Society, sont résumés par la figure 5 (où B, S et T ont la même signification que dans toutes les autres expériences mentionnées plus haut).

Pour la souche R_1 , les « effets » du benzoate et du salicylate semblent également indiscutables.

La souche bovine, Vallée, très atténuée, réagit aussi à la présence du salicylate et du benzoate ; comme le montre la figure 6,

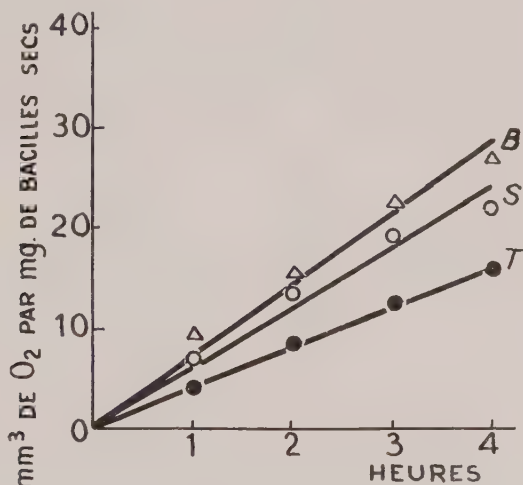


FIG. 6. — Effets du benzoate et du salicylate sur la respiration de la souche Vallée (bovine atténuée).

l'augmentation respective de la consommation globale d'oxygène par les bacilles âgés de 13 jours est approximativement de 40 p. 100 et de 70 p. 100 par rapport au témoin, en quatre heures.

Afin de faciliter la comparaison des « effets » benzoïque et salicylique obtenus avec les différentes souches virulentes et avirulentes de bacilles tuberculeux d'âges différents, nous avons groupé dans le tableau II certains résultats acquis sur une base expérimentale commune.

Ces expériences montrent que la respiration des bacilles tuberculeux, qu'ils soient virulents ou avirulents, est sensible à l'influence du benzoate et du salicylate. Dans les limites, plus ou moins larges, de la phase initiale de croissance, une culture de $H_{37}Rv.$ (S_1), comme celle du BCG, réagit au benzoate et au salicylate de façon relativement semblable pour chaque souche.

TABLEAU II. — Augmentation de la respiration de base de différentes souches virulentes et avirulentes de bacilles tuberculeux, en présence de benzoate et de salicylate de Na.

| SOUCHES | AGE | MILLIMÈTRES CUBES DE O ₂ CONSOMMÉS EN 4 HEURES par milligramme de bacilles secs | | |
|---|---------------|---|----------------|----------------|
| | de la culture | | | |
| | en jours | Témoin | Benzoate | Salicylate |
| <i>Virulentes.</i> | | | | |
| H ₃₇ Rv. (S ₁) . | 11 | 33,0 | 57,0 | 50,0 |
| H ₃₇ Rv. (S ₁) . | 20 | 33,9 | 57,1 | 51,4 |
| H ₃₇ Rv. (S ₂) . | 20 | 16,4 | 16,1 | 15,5 |
| H ₃₇ Rv. (S ₂) . | 30 | Non mesurable. | Non mesurable. | Non mesurable. |
| P | 23 | 17,1 | 30,5 | 23,5 |
| A | 19 | 15,0 | 34,5 | 26,0 |
| <i>Avirulentes.</i> | | | | |
| BCG | 7 | 17,5 | 24,0 | 27,0 |
| BCG | 8 | 16,2 | 23,5 | 27,8 |
| BCG | 9 | 16,0 | 22,5 | 26,5 |
| BCG | 10 | 17,9 | 23,5 | 28,0 |
| BCG | 20 | 0,38 | 0,40 | 0,32 |
| BCG bis. | 30 | 0,73 | 0,70 | 0,66 |
| H ₃₇ Ra. | 20 | 38,0 | 60,0 | 43,2 |
| H ₃₇ Ra. bis | 20 | 11,5 | 10,0 | 10,8 |
| R ₁ | 15 | 29,0 | 46,5 | 50,0 |
| Vallée | 13 | 15,5 | 26,8 | 22,2 |

Ces limites semblent pouvoir varier considérablement, même lorsqu'il s'agit de différents repiquages d'une même souche; l'âge réel d'une culture de bacilles tuberculeux n'ayant pas de rapport précis avec le nombre de jours passés à l'étuve. Une culture, après une incubation plus longue, peut manifester une activité physiologique plus intense, c'est-à-dire être plus jeune, qu'une autre culture, incubée moins longtemps, mais ayant poussé et vieilli plus rapidement. La respiration d'une culture physiologiquement plus âgée peut à la fois garder une certaine intensité et ne pas réagir au benzoate ou au salicylate. On sait que le développement d'une culture, effectuée sans aucune introduction d'éléments nouveaux, s'accompagne, au delà d'une certaine limite, d'un affaiblissement des enzymes adaptatifs qui pourrait expliquer en grande partie cette sorte d'inertie physiologique de bacilles « non réagissants » et la mortalité microbienne grandissante.

Il semble même qu'une culture microbienne apparemment jeune, telle que la culture de H₃₇Ra bis, qui n'occupait pas encore toute la surface du milieu de Sauton au moment de l'expérience, mais se développant avec une lenteur inhabituelle pour

cette souche et manifestant ainsi une certaine dégénérescence, puisse ne pas réagir au benzoate et au salicylate. Cet exemple nous permet seulement d'aborder le problème de dégénérescence des cultures de bacilles tuberculeux, dégénérescence qui, cette fois, semble être due non pas tant à l'âge de la culture même qu'à d'autres facteurs liés au complexe semence + milieu, et qui est néanmoins susceptible de rendre cette culture « non réagissante ». Il semble possible de supposer qu'une lenteur de croissance inhabituelle, pour le milieu donné, de $H_{37}Ra$ bis (culture non réagissante) ait également à sa base un affaiblissement et une insuffisance des enzymes, enzymes nécessaires, cette fois, à la semence pour s'adapter et assimiler normalement les constituants nutritifs du milieu synthétique de Sauton.

Les fig. 7 et 8 montrent respectivement la différence macroscopique que nous avons constatée entre les cultures de $H_{37}Ra$ (réagissante, voir fig. 4) et $H_{37}Ra$ bis (non réagissante), toutes les deux âgées de 20 jours sur milieu de Sauton.

Notons en outre que le benzoate ou le salicylate, ajoutés au milieu de Youmans à des concentrations de 1/1 000, 1/2 000, 1/3 000, 1/4 000, 1/5 000, 1/10 000, 1/100 000, ne semblent exercer aucun effet catalyseur sur la croissance ni de $H_{37}Rv.$, ni du BCG. Cependant, le benzoate, à des doses non bactériostatiques, semble pouvoir influencer le métabolisme des Mycobactéries. C'est ainsi que, en présence du benzoate, les cultures de $H_{37}Rv.$ et du BCG se pigmентаient plus fortement dans certains cas et, dans le cas du BCG, acquéraient un aspect plus gras.

Le benzoate, à la concentration de 1 p. 500 à 1 p. 1 000, et le salicylate, à la concentration de 1 p. 1 000 à 1 p. 2 000, arrêtaient la croissance de ces deux souches, malgré la présence d'albumine dans le milieu.

Si les « effets » benzoïque ou salicylique étaient des effets favorables aux bacilles, il paraîtrait en effet logique, dans le but de découvrir de nouveaux bactériostatiques, de chercher à les inhiber, c'est-à-dire de chercher une substance qui exercerait ainsi un effet défavorable sur les bacilles. Cependant, une augmentation de la respiration seule (QO_2) ne comporte pas nécessairement l'idée d'un effet favorable aux bacilles puisque, comme l'a montré Warburg [3], la toxicité d'une substance peut s'exercer dans certains cas par l'intermédiaire des oxydations accrues. Devant ce manque total d'évidence d'un effet favorable du benzoate et surtout du salicylate sur les bacilles tuberculeux, une substance chimique susceptible d'inhiber ces « effets » ne devrait donc pas nécessairement être une substance défavorable aux bacilles. Et inversement, les exemples du PAS [4] et de la streptomycine [5] montrent qu'une substance peut exercer un effet netto-



FIG. 7. — Aspect macroscopique de H_{37} Ra.

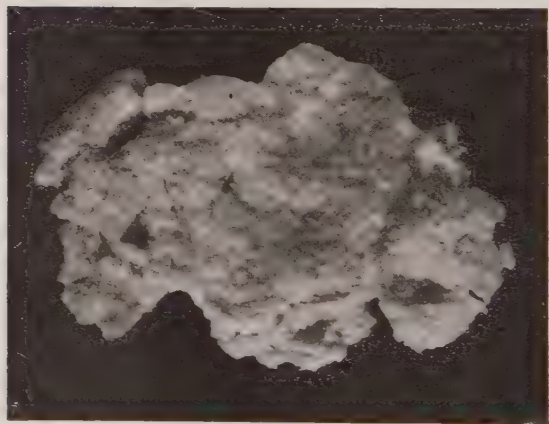


FIG. 8. — Aspect macroscopique de H_{37} Ra bis.

ment défavorable sur ces bacilles et ne pas influencer leur respiration. D'après Lehmann, le PAS n'exerce d'ailleurs aucune influence ni sur « l'effet benzoïque », ni sur « l'effet salicylique ». Ce fait a permis de constater qu'il n'y a aucune relation logique entre l'activité bactériostatique du PAS à l'égard des bacilles tuberculeux et le phénomène décrit par Bernheim. C'est, cependant, en suivant cette voie que Lehmann a abouti à sa belle découverte.

CONCLUSIONS.

L'augmentation de la respiration (Q_{O_2}) due au benzoate ou au salicylate (« effets » benzoïque et salicylique) n'est pas un phénomène constant des cultures de bacilles tuberculeux virulents. C'est ainsi qu'avec la souche virulente $H_{37}R_v$, nous avons pu obtenir ou ne pas obtenir ces « effets » suivant les différents stades de la culture.

Contrairement aux résultats de Lehmann, dans nos expériences, toutes les cultures de bacilles tuberculeux avirulents (BCG, $H_{37}Ra$, R_1) et atténués (Vallée), n'ayant pas dépassé la phase logarithmique de croissance, réagissaient au point de vue respiratoire au benzoate et au salicylate, de la même manière que les bacilles virulents. Nous pensons donc qu'il n'y a aucun rapport entre les « effets » benzoïque ou salicylique et la virulence des bacilles tuberculeux. Par contre, il existe un rapport entre l'état physiologique de la culture des bacilles tuberculeux virulents, comme avirulents, et le comportement de leur respiration à l'égard de ces acides.

La voie qui consiste à chercher une substance antibiotique inhibant les « effets » benzoïque ou salicylique ne semble pas avoir de justification théorique suffisante. Si, comme l'a montré Lehmann, un corps (PAS) peut être fortement tuberculostatique et n'exercer aucune influence sur « l'effet benzoïque » ou « l'effet salicylique », il semble également possible d'envisager qu'un corps puisse inhiber ces « effets » sans exercer nécessairement une action antibacillaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. BERNHEIM, *Science*, 1940, **92**, 204.
- [2] J. LEHMANN, *Lancet*, 5 janvier 1946, 15.
- [3] O. WARBURG, *Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs*. Fél. Alcan, édit., Paris, 1928.
- [4] J. LEHMANN, *Rev. Gén. des Sciences*, 1942, **54**, n° 9-10.
- [5] A. ANDREJEW, *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 778.

ETUDE SUR L'ADSORPTION DE L'EAU PAR DES BACTERIES

par BORIS IMELIK.

(Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose
et Laboratoire de Chimie générale à la Sorbonne.)

INTRODUCTION.

Si un gaz ou une solution est en contact avec un corps solide, une certaine quantité de gaz ou de substance dissoute se condense à la surface du solide. Ce phénomène a reçu le nom d'adsorption.

L'étude quantitative du phénomène montre qu'à température constante la variation de la quantité de gaz adsorbé (a) dépend de la pression (p). Si l'on porte la pression du gaz en abscisses et les quantités adsorbées en ordonnées, on obtient une courbe (appelée l'isotherme d'adsorption) qui a pour expression générale :

$$a = f(p) \quad T = \text{constante.}$$

Dans certains cas l'adsorption s'arrête quand la substance adsorbée recouvre totalement la surface de l'adsorbant d'une couche monomoléculaire. On obtient alors une courbe dont la concavité est tournée vers l'axe des pressions tendant asymptotiquement vers une limite quand la pression croît de plus en plus.

D'après Langmuir, l'isotherme d'adsorption est alors définie par la relation :

$$a = zp/y + p$$

où z et y sont deux constantes.

Cependant il est fréquent que l'adsorption continue après que le solide ait été tapissé d'une couche monomoléculaire du gaz adsorbé. Nous obtenons alors des isothermes d'une forme d'S, appelées type 2 d'après Brunauer, constituées d'une première section (à basse pression) concave vers l'axe des pressions, ensuite d'une partie plus ou moins rectiligne et finalement d'une troisième partie qui montre une augmentation sensible de la quantité du gaz adsorbé quand la pression devient de plus en plus grande. Ce type d'isotherme caractérise l'adsorption de la

vapeur d'eau par les protéines, pour ne citer que cet exemple.

Les isothermes d'adsorption de cette forme ne peuvent pas être expliquées par les théories classiques de l'adsorption comme celles de Langmuir ou de Freundlich. C'est seulement la théorie de l'adsorption multimoléculaire imaginée par Brunauer, Emmet et Teller (1) [exposée en détail dans l'excellente monographie de Brunauer], qui a fourni une explication générale de ce type d'adsorption et a permis sa formulation mathématique.

L'application de cette théorie à l'adsorption de l'eau par les protéines a montré que les isothermes vérifient la formule BET dans les limites habituelles, permettant ainsi une analyse de ces courbes.

Cependant il reste des incertitudes sur la nature du phénomène. Bull [3], ayant étudié de nombreux échantillons purifiés, propose pour les protéines une structure analogue à celle de la monmorillonite. Rappelons que la monmorillonite est un silicate double de Mg et d'Al constitué de feuillets empilés (Hendricks, Nelson et Alexander [4], Mering [5]). Le phénomène d'adsorption de l'eau par ce minéral consiste en une pénétration de celle-ci entre les feuillets élémentaires, qu'elle écarte. Dans l'espace ainsi créé, les molécules d'eau s'organisent en couches et le nombre des couches augmente avec l'humidité du milieu. Toutefois, la cohésion de l'édifice cristallin est maintenue, car l'écartement des feuillets élémentaires est limité à 4 couches de molécules d'eau.

D'une manière analogue, les protéines auraient alors une architecture stratifiée, ou constitueraient un assemblage de particules élémentaires qui, bien qu'elles soient liées entre elles d'une façon plus ou moins rigide, posséderaient une certaine liberté de mouvement. Si les liaisons entre les particules ou les feuillets sont faibles, l'adsorption d'eau peut provoquer leur rupture suivie d'une libération des particules, ce qui serait le cas pour les protéines solubles dans l'eau. Cette hypothèse est, dans une certaine mesure, conforme aux observations obtenues par d'autres techniques (Katz et Derksen [10], Dervichian [11]). Nous devons à Pauling d'autres précisions sur le caractère de l'adsorption de l'eau par des matières protéiniques. Il a révisé les résultats expérimentaux de Bull et de Shaw et prétend que la fixation de l'eau est essentiellement due aux groupements polaires libres.

Selon cette conception, l'adsorption de l'eau caractériserait ces groupes et serait fonction du nombre de ceux-ci. En utilisant les données expérimentales de Bull et de Shaw [7], Pauling [6] a calculé le nombre de groupements polaires libres et l'a comparé au nombre trouvé par l'analyse chimique.

(1) Nous utiliserons par la suite l'abréviation « BET » couramment employée dans la bibliographie correspondante.

L'accord est très satisfaisant et a été confirmé par des travaux ultérieurs [8, 9].

Il faut remarquer que les points de vue respectifs de Bull et de Pauling ne sont pas en contradiction, mais sont en quelque sorte complémentaires. En effet, l'adsorption de l'eau dans le cas des protéines est un phénomène complexe : ce ne sont pas seulement les caractéristiques de division de la matière mais aussi et surtout la structure des molécules (groupements polaires libres) qui caractérisent l'adsorption.

Bien que le problème soit encore insuffisamment défini, il est permis de penser que l'étude de l'adsorption de l'eau et le calcul des constantes d'après la théorie BET constituent néanmoins un moyen de caractérisation des matières protéiniques. Il nous a semblé intéressant d'appliquer cette méthode à l'étude des bactéries, principalement constituées de protéines, en vue de caractériser leur état, leur structure et l'évolution éventuelle de ceux-ci.

TECHNIQUE.

a) MATÉRIEL BIOLOGIQUE. — Nous avons utilisé, au cours de cette étude, une souche de *Pseudomonas aeruginosæ*, bâtonnet Gram —, une souche de Staphylocoques dorés, coques Gram + et une souche de *Mycobacterium phlei*, bâtonnet acido-résistant et Gram +.

Les deux premières souches ont été préparées pour les expériences d'adsorption de la façon suivante :

Les cultures des bactéries de dix-huit à vingt-quatre heures sur gélose nutritive ordinaire ont été lavées longuement à l'eau saline et finalement à l'eau distillée, la séparation des bactéries se faisant après chaque lavage par centrifugation.

Le *Mycobacterium phlei* a été cultivé dans le milieu de Sauton et, pour une autre série d'expériences, sur du bouillon glyciné. La pellicule a été filtrée sur papier et lavée avec de l'eau saline, puis de l'eau distillée.

Dans certaines expériences, des bactéries séchées ont été utilisées. Dans ce cas, les bactéries préparées comme précédemment ont été déshydratées sous vide à 37° C sur P_2O_5 .

Nous appellerons poids sec des bactéries, celui obtenu en les desséchant sous vide à 37° C sur P_2O_5 . Il est vraisemblable que, dans ces conditions, la déshydratation n'est pas complète ; une déshydratation plus poussée est impossible à obtenir (comme cela a été fait avec les protéines purifiées sous vide et à 70° C) sans risquer une altération plus ou moins prononcée.

b) CONDITIONS D'ADSORPTION. — L'étude de l'adsorption de la vapeur d'eau a été faite suivant la technique de van Bemmelen, technique employée aussi par Bull pour ses études de protéines.

Cette technique consiste à placer l'échantillon dans des récipients clos (nous avons employé des dessiccateurs) maintenus à température constante. La tension de vapeur d'eau est réalisée et contrôlée au moyen d'acide sulfurique à différentes concentrations. L'échantillon est laissé sous une pression de vapeur donnée jusqu'à obtention de l'équilibre.

Les variations de poids, correspondant à l'adsorption ou à la désorption, ont été constatées par des pesées sur une bonne balance analytique. Les expériences ont été exécutées à 30° C.

Nous avons rencontré un certain nombre de difficultés au cours de cette étude. Il a été constaté que pendant le premier cycle de déshydratation et aussi d'une manière générale pour des pressions élevées de vapeur d'eau (pression relative $x > 0,9$), la moindre contamination microbienne fausse l'expérience. L'équilibre aux pressions élevées étant obtenu seulement au bout de plusieurs jours et même de plusieurs semaines, ces expériences de longue durée présentent ainsi des conditions propices à la prolifération de germes étrangers et en particulier à celle de moisissures. Il faut donc utiliser des récipients stérilisés et travailler en observant autant que possible les règles d'asepsie. De plus, diverses altérations, par exemple l'action des ferments autolytiques, peuvent prendre libre cours aux tensions de vapeur élevée. Pour cette raison, nous avons souvent employé plusieurs échantillons séparés pour les pressions de vapeur élevées, et un autre pour des pressions $x < 0,8$, mis successivement en présence de différentes pressions de vapeur formant le cycle complet adsorption-désorption.

c) PRINCIPE DES MESURES ET NOTATION. — Les isothermes d'adsorption ont été interprétées d'après la théorie de l'adsorption multimoléculaire (Brunauer, Emmet et Teller [1, 2]) qui s'exprime pour l'adsorption illimitée au moyen de l'équation suivante :

$$a = \frac{a_1 c p}{p^0 - p(1 + (c-1)p/p^0)} \quad \text{où} \quad (1).$$

a est le poids de l'eau adsorbée sous la pression p .

p^0 , la pression de vapeur de l'eau à saturation.

a_1 , le poids de l'eau adsorbée dans la première couche
 $c = e^{(E - E_L)/RT}$.

E , la chaleur d'adsorption moyenne pour la première couche.

E_L , la chaleur de liquéfaction de l'eau.

[Comme les auteurs précédents, nous avons adopté la notation de Bull, bien que celle-ci (a , a_1 et a_2) puisse prêter à confusion.]
 Pour vérifier l'équation 1 on l'écrit sous sa forme linéaire :

$$p/a(p^0 - p) = \frac{1}{a_1 c} + \frac{c-1}{a_1 c} p/p^0 \quad (1').$$

On voit que l'équation 1' représente une droite qui a pour pente

$$\frac{c-1}{a_1 c}$$

et coupe l'axe $p/(p^\circ - p)$ au point $1/a_1 c$.

Dans le cas des protéines ou des bactéries, il est assez difficile de préciser la signification des constantes calculées à partir de ces équations. Les isothermes ne permettent pas de déterminer (sauf en de rares exceptions) l'importance de l'adsorption physique ou de l'hydratation des groupements polaires par rapport à l'ensemble du phénomène d'adsorption de l'eau ; nous pouvons seulement observer la courbe résultant de la superposition de ces deux mécanismes. Pour cette raison, nous nous contentons de donner à la constante a_1 une définition générale, sans préciser sa nature physique ou chimique : la constante a_1 caractérise la quantité de la matière spécifique relative à l'adsorption de l'eau. Elle donne la possibilité de décrire les propriétés de cette matière, permet de faire des comparaisons sur sa quantité et de fixer le sens de l'évolution de celle-ci.

C'est aussi dans un sens général et purement descriptif que nous parlons, par la suite, de la « surface » ou de la « surface libre » relative à l'eau. Ainsi la « surface » dont nous parlons dans ce travail n'a pas la même signification que celle qu'on peut déterminer par l'adsorption d'azote à basse température.

La constante c permet d'évaluer l'ordre de grandeur de la chaleur d'adsorption et de suivre les variations de celle-ci.

L'énergie libre nécessaire pour transférer les molécules d'eau en phase vapeur à la surface du solide caractérise l'affinité du corps pour l'eau. L'échange d'énergie libre se calcule d'après l'équation :

$$\Delta F = \frac{RT}{M} \int_{x_0}^1 \frac{a dx}{x} \quad \text{où} \quad (2).$$

a a la même signification que dans l'équation 1.

$x = p/p^\circ$, la pression relative de la vapeur d'eau.

M , le poids moléculaire de l'eau.

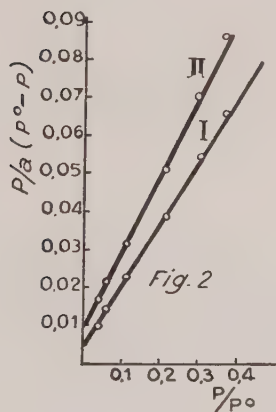
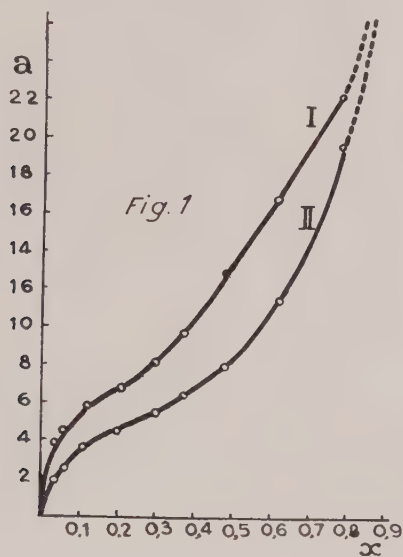
En portant sur un système d'axes rectangulaires les variations de a/x en fonction de x , on obtient une courbe dont le point le plus bas est désigné par a_2 .

Pour calculer ΔF , il suffit de mesurer l'aire limitée par cette courbe et la multiplier par RT/M .

Cependant, nous avons employé la méthode de Boyd et Livingstone [12] pour intégrer l'équation 2, car l'aire est difficilement mesurable pour les basses pressions. Signalons aussi que la valeur de a pour le point $x = 1$, déterminée d'une manière

peu précise par expérience, a été obtenue par extrapolation de la courbe.

Si la quantité d'énergie libérée est divisée par la quantité



d'eau correspondante, on obtient une mesure de l'affinité moyenne dans la région de pression de vapeur considérée. Nous avons calculé le $\Delta F/1 \text{ g H}_2\text{O}$, pour les régions caractérisées par a_1 et a_2 .

Comme on peut le constater plus loin (tableaux I et II), la valeur

de la constante a_2 est presque toujours le double de celle de a_1 ; si on admet que cette règle est toujours observée, on peut calculer approximativement la quantité a_1 dans les cas où l'isotherme vérifie mal l'équation BET pour les basses pressions.

La constante a_2 signifie, d'après Bull, la fin de la formation d'une deuxième couche monomoléculaire sur le solide. Mais d'après la conception de Pauling, on peut l'interpréter aussi comme étant la quantité d'eau caractérisant la fin de la fixation d'une deuxième molécule d'eau par les groupements polaires.

A l'heure actuelle, il n'est pas possible de donner une signification définitive à cette constante; nous indiquons cependant qu'elle nous sera utile pour préciser certaines évolutions.

Signalons finalement que tous les résultats sont exprimés en grammes d'eau rapportés à 100 g de bactéries séchées. La reproductibilité des expériences a été en général satisfaisante, les variations ne dépassant pas 5 p. 100.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — Dans une première série d'expériences, nous avons étudié les limites d'application de l'équation BET. Dans la figure 1 nous avons représenté quelques isothermes typiques de désorption obtenues avec les bactéries dans leur état initial (non séchées). Dans la figure 2 nous avons représenté les isothermes de la figure 1 transformées d'après l'équation 1'. On constate que l'accord est très satisfaisant, l'équation BET étant vérifiée dans les limites habituelles ($0,05 \leq x \leq 0,4$). Les constantes calculées d'après les équations 1 et 2 sont résumées dans le tableau 1.

TABLEAU 1.

| | a_1 | a_2 | c | ΔF | $\Delta F/1 \text{ g H}_2\text{O}$ | |
|--|-------|-------|------|------------|------------------------------------|-------|
| | | | | | a_1 | a_2 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6,4 | 12,9 | 35,5 | - 1 500 | 47 | 60,5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 5,4 | 10,9 | 48,5 | - 1 400 | 55 | 69 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> âgé de 15 jours de provenance du milieu de Sauton | 4,2 | 8,5 | 23,0 | - 955 | 56 | 47 |

Il n'est pas possible de donner ici les calculs assez longs des courbes d'échange de l'énergie libre relatives à la quantité d'eau adsorbée ou désorbée. Ces courbes montrent qu'à basse pression l'échange d'énergie libre pour 1 g d'eau adsorbée est sensiblement constant jusqu'à ce que les bactéries contiennent de 1 à 3 p. 100 d'eau. Cette région à pente constante est suivie d'un accroissement très sensible présentant un maximum pour un

point situé entre les quantités a_1 et a_2 . Ensuite on observe un palier, parfois une légère décroissance jusqu'au point a_2 . Après ce point une baisse brusque et ensuite une diminution de la pente qui, finalement, s'annule au point de saturation. Cette variation a pour conséquence que le $\Delta F/1 \text{ g H}_2\text{O}$ est en général plus élevé dans la région a_2 que dans celle de a_1 . Dans d'autres cas cependant, le maximum est déplacé vers la gauche et concorde sensiblement avec le point a_1 (*Mycobacterium phlei*, âgé de 15 jours, de provenance du milieu de Sauton).

Nous concluons, de ce résumé de l'étude d'échange de l'énergie libre, que l'affinité des bactéries pour l'eau augmente pendant l'adsorption, passant par un maximum au point a_1 ou entre les points a_1 et a_2 .

Si on compare les bactéries avec des protéines (voir les résultats dans le mémoire de Bull), on constate que les constantes calculées sont du même ordre de grandeur et que, d'une façon générale, les bactéries se comportent à l'égard de l'adsorption de l'eau comme des matières protéiniques. On peut observer que les valeurs des constantes c et a_1 sont légèrement inférieures pour les protéines à celles trouvées pour les bactéries. Mais en réalité l'écart est plus petit, car les chiffres donnés par Bull représentent la moyenne de c et a_1 en cours d'adsorption, puis de désorption, obtenus avec des protéines séchées. Pour nos bactéries, ces constantes représentent l'isotherme d'une première désorption des bactéries dans leur état naturel. Nous avons, en effet, constaté, dans une deuxième série d'essais, que les constantes calculées à partir du cycle d'adsorption sont jusqu'à 12 p. 100 plus petites et celles calculées pour un deuxième cycle de désorption peuvent montrer une diminution de l'ordre de 7 à 9 p. 100 par rapport à la première désorption. Signalons qu'un deuxième et un troisième cycle d'adsorption-désorption ne semblent plus causer de variations. Les courbes d'échange d'énergie libre et la quantité $\Delta F/1 \text{ g H}_2\text{O}$ pour la région a_2 sont, dans certains cas différentes : la plupart des protéines se comportent comme *Mycobacterium phlei*, âgé de 15 jours, et de provenance du milieu de Sauton.

En comparant les bactéries entre elles, il est intéressant de souligner l'affinité relativement plus faible, ainsi que la valeur plus faible de la constante a_1 trouvée pour *Micobacterium phlei* cultivé quinze jours sur milieu de Sauton.

Il est évident que cette bactérie contient moins de matière spécifique relative à l'adsorption de l'eau, ce fait étant probablement lié à sa grande richesse en lipoides.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié l'influence de l'âge de la culture et l'importance du milieu de culture. Pour ces essais, nous avons choisi le *Mycobacterium*

phlei à cause de son long cycle de croissance, la probabilité de la constatation de différences éventuelles étant ainsi considérablement accrue. Les résultats sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II.

| | a_1 | a_2 | c | ΔF | $\Delta F/16 H_2O$ | |
|------------------------------|-------|-------|-----------------------------|------------|--------------------|------------|
| | | | | | α_1 | α_2 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> : | | | | | | |
| a) Milieu de Sauton : | | | | | | |
| Agé de 4 jours | 5,7 | 11,4 | 45 | — 1 100 | 51 | 56 |
| Agé de 15 jours. | 4,2 | 8,5 | 23 | — 955 | 56 | 47 |
| b) Bouillon glycérimé : | | | | | | |
| Agé de 4 jours | 5,2 | 10,4 | $c_1 = 4,0$ $c_2 = 85,0$ | — 1 390 | 37 | 85 |
| Agé de 15 jours | 4,6 | 9,2 | 98,2 | — 1 280 | 55 | 72 |

Il ressort nettement de ces chiffres qu'une culture jeune a une surface relative à l'adsorption de l'eau beaucoup plus grande qu'une culture de quinze jours. De même la chaleur d'adsorption est plus grande pour les cultures âgées de 4 jours.

Le cas de *Mycobacterium phlei*, cultivé quatre jours sur bouillon glycérimé, présente un intérêt tout particulier. L'analyse de l'isotherme d'adsorption nous révèle, dans ce cas, deux droites : une première pour la région des basses pressions (constante $c_1 = 4,0$) et ensuite, à partir de $x = 0,11$, une autre droite, caractérisée par $c_2 = 85,0$. Il est évident que la chaleur d'adsorption dans chacune de ces deux régions doit être très différente et notamment beaucoup plus élevée dans la seconde.

On pourrait faire l'hypothèse qu'à partir de $x = 0,11$, une partie très active de la matière, n'étant pas accessible jusqu'ici, a été libérée et que l'adsorption se fait maintenant sur ces centres plus actifs.

Pour la culture de quinze jours sur le même milieu nous ne trouvons plus ce comportement ; la séparation en deux mécanismes bien déterminés s'est effacée et l'analyse d'isotherme révèle une droite seulement, avec les constantes indiquées dans le tableau II.

Cependant, la matière la plus active ne semble pas être totalement accessible immédiatement. Elle participe seulement progressivement à l'adsorption, la partie la plus importante étant libérée seulement dans la région a_2 . Il y a donc des changements profonds dans la structure des bactéries par rapport à la culture de quatre jours, caractérisés par la diminution de la quantité

de matière relative à l'adsorption de l'eau (on pourrait penser que dans les cultures âgées une partie de la surface reste définitivement bloquée) et par des altérations dans le nombre, la répartition statistique et l'emplacement des centres actifs.

En simplifiant les choses, la structure des bactéries nous rappelle une structure stratifiée ; l'adsorption de l'eau serait suivie d'une interpénétration qui écarterait la matière en libérant la surface active cachée sous celle-ci. Par conséquent, la participation de la surface totale serait donc seulement progressive, l'isotherme observée étant l'expression de la superposition de différents mécanismes.

Il nous reste à discuter la valeur biologique de ces essais. Il est évident que certaines objections seraient justifiées : la valeur biologique de ces essais est diminuée par les conditions requises pour cette technique et par l'incertitude de la signification exacte des constantes caractérisant le phénomène d'adsorption. Cependant, ces expériences gardent toute leur valeur comparative, car pour la région des basses pressions qui est la plus importante pour les calculs des constantes, les altérations biologiques sont très peu vraisemblables à cause de la faible teneur en humidité. De même la reproductibilité des expériences est satisfaisante.

Bien que l'interprétation ne puisse pas être définitive, nous croyons avoir démontré pour la première fois que les constantes calculées en appliquant l'équation BET peuvent caractériser certaines évolutions accessibles seulement grâce à cette technique. Nous sommes capables d'en tirer de nombreux renseignements qualitatifs, appuyés par des chiffres qui indiquent au moins l'ordre de grandeur.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. BRUNAUER. *The Adsorption of Gases and Vapours*. London, 1945.
- [2] S. BRUNAUER, P. H. EMMET et E. TELLER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309.
- [3] H. B. BULL. *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1499.
- [4] S. B. HENDRICKS, R. A. NELSON et L. T. ALEXANDER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 1457.
- [5] J. MERING. *Bull. Soc. Chim. de France*, 1949, **16**, 218.
- [6] L. PAULING. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 555.
- [7] T. M. SHAW. *J. Chem. Phys.*, 1944, **12**, 391.
- [8] E. F. MELLON, A. H. KORN et S. R. HOOVER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 827 ; 1948, **70**, 1144, 3040 ; 1949, **71**, 2761.
- [9] S. W. BENSON, D. A. ELLIS et R. W. ZWANZIG. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2102.
- [10] J. R. KATZ et J. C. DERKSEN. *Rec. Trav. chim.*, 1932, **51**, 513.
- [11] D. G. DERVICHIAN. *J. Chim. Phys.*, 1941, **37**, 72.
- [12] G. E. BOYD et H. K. LIVINGSTONE. *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 2283.

ACTION DES SELS DE CUIVRE SUR LES ÉRYTHROCYTES

par SUZANNE LAMBIN, SUZANNE BAZIN et ALBERTINE SALAS (*).

(Faculté de Pharmacie. Laboratoire de Sérologie.
Institut de Biologie physico-chimique, C. N. R. S.)

Les sels de métaux lourds sont au nombre des substances qui se fixent sur les érythrocytes et peuvent en provoquer la lyse, soit qu'ils pénètrent à l'intérieur de l'hématie et en augmentent la pression osmotique interne, soit que les ions s'absorbent sur la surface limitante cellulaire ou se combinent avec certains constituants de cette surface, tous processus susceptibles de modifier la perméabilité des érythrocytes. Cette hémolyse peut d'ailleurs parfois faire place, comme l'ont montré les observations de R. Dujarric de la Rivière [5], à une simple agglutination, lorsque varie la concentration du sel métallique. Par ailleurs, il est bien connu, depuis les travaux de Hamburger [9], que les hématies sont particulièrement perméables aux anions.

Ces diverses constatations nous ont incitées à rechercher si l'action des sels métalliques sur les globules rouges, jusqu'ici considérée comme une propriété inhérente aux cations, n'était pas influencée par la nature de l'anion combiné au cation métallique. On sait, en effet, comme l'ont montré les travaux de J. Régnier et de ses élèves [13], combien le rôle de l'anion s'est révélé important dans l'activité biologique et physico-chimique de diverses substances salines ou alcaloïdiques.

Dans la recherche de l'activité hémolytique des divers sels de quinine, J. Régnier a constaté, avec A. Quevauviller [12], que les acides chargés de plusieurs groupements polaires (tartrate, citrate, gluconate) confèrent à la quinine une moindre activité hémolytique que ne le font les acides organiques aliphatiques ou aromatiques pourvus d'un seul groupement carboxylique (isobutyrate-phénylacétate, etc.).

Poursuivant l'étude de l'influence de l'anion sur diverses activités des sels de cuivre, nous avons été amenées à considérer l'activité hémolytique de divers sels. Nous avons examiné l'action de chacun d'eux sur les phénomènes d'hémolyse et de résistance à l'hypotonie, et sur le volume érythrocytaire. Nous avons

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1951.

recherché les *modifications* qu'ils pouvaient entraîner dans la *perméabilité* des hématies à l'égard de diverses substances (glycocholate de sodium, urée, sulfate de quinine, éthanol), et dans la *charge électrique* des érythrocytes.

PROTOCOLE DES ESSAIS. — Les *érythrocytes* utilisés provenaient de sang de lapin, fraîchement prélevé, défibriné par agitation avec des billes de verre. Séparés par centrifugation lente, ils étaient, après deux lavages au soluté de Ringer, remis en suspension dans une quantité de solution isotonique (chlorure de sodium à 8 g pour 1 000 ou saccharose à 100 g pour 1 000, pH = 7,4) permettant de rétablir le volume initial du sang.

Ces suspensions furent amenées aux dilutions respectives de 1/100 pour les essais d'hémolyse et de résistance à l'hypotonie, 1/3 pour les mesures de volume érythrocytaire, de 1/500 pour les mesures de charge électrique.

Les *solutions des différents sels de cuivre* étaient préparées extemporanément en solutés isotoniques de chlorure de sodium ou de saccharose (1) [pH = 7,4], et lorsque la concentration en sel de cuivre était assez forte pour influencer le pH du milieu, celui-ci était ramené à pH 7,4 par addition d'une quantité très limitée de soude diluée; ceci, afin d'éviter l'utilisation des tampons couramment employés pour ces essais d'hémolyse, lesquels auraient introduit dans le milieu d'essai des anions étrangers à ceux dont l'action était recherchée.

Les sels de cuivre étudiés furent les : sulfate, citrate, tartrate, benzoate, phénylpropionate, phénylbutyrate.

I. ETUDE DE L'HÉMOLYSE. — Dans une série de tubes à hémolyse nous avons réparti 1,5 cm³ de suspension d'hématies et 1,5 cm³ de solution des divers sels de cuivre, de telle sorte que la concentration finale en cuivre varie de 0,1 à 0,001.10⁻³ mol. par litre. Les tubes placés à l'étuve à 37°, pendant trois heures, lorsque l'isotonie était assurée par du chlorure de sodium, et pendant une demi-heure, lorsqu'elle était assurée par du saccharose (2), étaient ensuite centrifugés pendant trois minutes à 1 500 tours/minute, puis le liquide surnageant était examiné au photomètre (diffuso-absorptiomètre de Dognon).

Tous les sels étudiés nous ayant fourni des résultats sem-

(1) La suspension en solution de saccharose présente l'avantage d'éviter l'introduction dans le milieu de tous ions autres que ceux des sels de cuivre étudiés, et par conséquent toute interaction ionique possible.

(2) L'absence d'ions dans le milieu isotonique favorise la perte des sels intracellulaires et rend les hématies plus fragiles. Un séjour prolongé à l'étuve, dans ce milieu non ionisé, pourrait provoquer une hémolyse spontanée.

blables, nous donnons ci-dessous, à titre d'exemple, le résultat d'une expérience réalisée avec le sulfate de cuivre.

| | CONCENTRATION en cuivre pour 1 000 cm ³ (en M.10 ⁻³) | DÉVIATION du galvanomètre | POURCENTAGE d'hémolyse |
|---|--|---------------------------------|---------------------------|
| Témoin des hématies (suspension en eau physiologique) . . | 0 | 0 | 0 |
| | 0,001 | 0 | 0 |
| | 0,010 | 0 | 0 |
| | 0,013 | 48 | 23,5 |
| | 0,020 | 58 | 76 |
| | 0,050 | 76 | 100 |
| | 0,10 | 76 | 100 |
| Témoin d'hémolyse (suspension en eau distillée) | 0 | 76 | 100 |

La limite d'hémolyse, pour tous les sels de cuivre mis en expérience, était donc située à la concentration de 0,013.10⁻³ mol. de sel de cuivre par litre (soit 0,0032 g de sulfate de cuivre cristallisé par litre).

Aux concentrations plus faibles de cuivre : 0,001 à 0,010.10⁻³ mol. on observe une agglutination des hématies alors que des doses inférieures à 0,001.10⁻³ mol. de cuivre se montraient totalement inactives.

II. MESURE DE LA RÉSISTANCE A L'HYPOTONIE. — Dans chacun des tubes à hémolyse d'une première série, nous avons réparti : 3 cm³ de suspension d'hématies en solutions de titres croissants en ClNa, la concentration finale en ClNa variant de 3 à 8 g pour 1 000 cm³, et l'écart de concentration d'un mélange au suivant étant de 0,20 g p. 1 000. Une seconde série recevait 3 cm³ de ces mêmes suspensions d'hématies en solution de ClNa à concentrations croissantes, mais contenant en outre une dose non hémolytique des sels de cuivre (0,0066.10⁻³ mol. par litre). Deux séries parallèles furent établies, dans lesquelles les solutions de ClNa étaient remplacées par des solutions de saccharose d'un titre variant de 10 à 100 g par litre, la progression entre chaque tube étant de 5 g de saccharose pour 1 000 cm³. Après séjour à l'étuve et centrifugation, la lecture des résultats était effectuée dans les conditions ci-dessus énoncées.

Ici encore, les résultats ont été identiques pour tous les sels de cuivre mis en essai : *La limite d'hémolyse a été observée à 5,20 g de chlorure de sodium par litre ou 35 g de saccharose par litre, dans les deux séries de tubes, c'est-à-dire aussi bien en l'absence qu'en présence de sel de cuivre.* Les sels de cuivre,

à dose non hémolytique, n'ont donc pas modifié la résistance à l'hypotonie des hématies de lapin.

III. MESURE DU VOLUME DES HÉMATIES. — Les essais ont été réalisés en établissant les gammes de suspensions d'hématies :

A. — En eau physiologique contenant des concentrations finales non hémolytiques des différents sels de cuivre, variant de 0,001 à $0,01 \cdot 10^{-3}$ mol.

B. — En solutions de ClNa , à concentrations croissant de 5 à 10 g de ClNa par litre (progression, 0,20 g p. 1 000).

C. — Dans ces mêmes solutions de ClNa , contenant en outre une dose non hémolytique de chaque sel de cuivre : $0,0066 \cdot 10^{-3}$ mol. par litre.

Des séries parallèles ont été préparées avec des suspensions d'hématies :

D. — Dans les solutions de différents sels de cuivre à concentrations non hémolytiques, isotonisées par le saccharose.

E. — Dans des solutions de saccharose, de titre variant de 60 g à 110 g par litre, la progression d'un tube à l'autre étant de 5 g par litre.

F. — Dans ces mêmes solutions de saccharose, mais en présence de $0,0066 \cdot 10^{-3}$ mol. de sel de cuivre par litre.

Après séjour à l'étuve à $+37^\circ$, soit de trois heures (A, B, C), soit de trente minutes (D, E, F), les tubes ayant été agités, la suspension était centrifugée dans un hématocrite.

Nous donnons, à titre d'exemple, les valeurs obtenues avec le sulfate de cuivre, tous les sels à l'étude nous ayant fourni des résultats identiques, aussi bien en solution saline qu'en solution saccharosée.

Résultats de la série A (titre constant en ClNa : 8 g p. 1 000) :

| | | | | | |
|---|----|-------|-------|-------|-------|
| Titre en cuivre (mol. $\times 10^{-3}$). | 0 | 0,001 | 0,002 | 0,005 | 0,010 |
| Volume à l'hématocrite (p. 100). | 25 | 25 | 25 | 25 | 25,5 |

Résultats de la série B (titre en cuivre : 0) et de la série C (titre en cuivre : 0,0066, mol. 10^{-3} p. 1 000) :

| | | | | | | |
|---|-----|-----------|---------|---------|-----|------|
| Titre en ClNa (p. 1 000 cm ³). | 5,2 | 5,4 à 5,6 | 6 à 7,6 | 8 à 9,4 | 9,6 | 10 |
| Volume à l'hématocrite (p. 100). | 29 | 28 | 26 | 25 | 24 | 23,5 |

Ainsi, le volume des hématies n'a pas été modifié par une dose non hémolytique de sel de cuivre, que les hématies aient été placées en milieu isotonique (A et D) ou en milieu faiblement hypotonique ou hypertonique (B, C et E, F).

IV. ESSAI DE MISE EN ÉVIDENCE DE L'INFLUENCE DU CUIVRE SUR L'ACTION HÉMOLYTIQUE DE DIVERSES SUBSTANCES. — Les hématies étaient mises en suspension dans des solutions à titres croissants

des substances à l'étude, préparées soit en solution isotonique de chlorure de sodium, soit dans ce même soluté additionné d'une dose non hémolytique de l'un des sels de cuivre ($0,0066 \cdot 10^{-3}$ mol. par litre).

Deux séries d'essais parallèles étaient réalisées en remplaçant le chlorure de sodium par une solution de saccharose à concentration isotonique (100 g par litre). Dans une troisième série d'expériences, les hématies ont été mises en contact avec une concentration non hémolytique de chaque sel de cuivre ($0,0066 \cdot 10^{-3}$ mol. par litre), pendant trente minutes à $+ 37^{\circ} \text{C}$, puis séparées par centrifugation avant d'être introduites dans des solutions à titre croissant de la substance à l'étude, soit en solution saline, soit en solution saccharosée isotonique. Après séjour à l'étuve, le degré d'hémolyse a été observé comme précédemment.

Les substances hémolytiques mises en expérience étaient : le glycocholate de sodium, l'urée, le sulfate de quinine, l'alcool éthylique, utilisées aux concentrations suivantes :

| | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Glycocholate de Na | 1 à $0,005 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |
| Urée | 4 à 0,5 M |
| Sulfate de quinine | 2 à $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |
| Alcool éthylique | 2 à 0,01 M |

Tous les sels de cuivre étudiés nous ont fourni les résultats identiques ci-dessous rapportés :

Concentrations limites hémolytiques.

| SOLUTION EN : | GLYCOCHOLATE de sodium | URÉE | SULFATE de quinine | ALCOOL éthylique |
|--|--------------------------------|-------|--------------------------------|---------------------|
| Chlorure de sodium isotonique. . | $0,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 1,4 M | $0,46 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 0,5 M |
| Chlorure de sodium isotonique + sel de cuivre. . . | $0,01 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 1,2 M | $0,28 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 0,1 M |
| Chlorure de sodium isotonique (après contact). . . . | $0,01 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 1,2 M | $0,28 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 0,1 M |
| Saccharose isotonique. | $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 3,2 M | $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 1,7 M |
| Saccharose isotonique + sel de cuivre | $0,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 2,7 M | $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 1 M |
| Saccharose isotonique (après contact). | $0,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 2,7 M | $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | 1 M |

Ces résultats mettent donc en évidence, pour toutes les substances mises en expérience, *une diminution de la dose limite hémolytique sous l'influence des sels de cuivre*, que ceux-ci agissent sur les hématies, en même temps qu'elles, ou qu'ils aient été préalablement fixés par ces hématies.

V. MESURE DE LA CHARGE ÉLECTRIQUE DES ÉRYTHROCYTES. — La charge électrique des hématies a été étudiée par la méthode d'électrophorèse de N. Choucroun [2]. Les mesures ont été effectuées à 18°, d'une part sur des hématies témoins, d'autre part sur des hématies provenant de la même préparation et mises en contact pendant trente, soixante ou cent vingt minutes avec les divers sels de cuivre, à concentrations croissantes (0,0033 à 0,01.10⁻³ mol. par litre). Les hématies séparées des solutions de cuivre par centrifugation de dix minutes, à 1 500 tours/minute, étaient remises en suspension dans une solution isotonique de chlorure de sodium de pH 7,4.

Quel que fût le sel de cuivre utilisé, et quelle que fût sa concentration, les résultats obtenus, et ci-dessous rapportés, ont été identiques :

Mobilité électrophorétique (distance parcourue, en μ , en une seconde, dans un champ de 1 volt/cm).

Hématies témoins 0,594

Hématies mises au contact des sels de cuivre pendant :

30 minutes 0,361

60 minutes 0,304

120 minutes 0,294

On constate donc que *les sels de cuivre abaissent notablement la charge électrique des hématies*, et d'autant plus que leur contact avec les hématies a été plus prolongé.

DISCUSSION.

Les résultats de nos différents essais montrent que, dans aucun cas, l'influence de l'anion n'a pu être décelée dans l'action des sels de cuivre sur les érythrocytes. Dans tous les phénomènes envisagés, tous les sels, qu'ils soient constitués par un anion à nombreux groupements polaires (citrate, tartrate) ou par un anion minéral (sulfate) ou organique ne possédant pas d'autre fonction que le carboxyle (benzoate, phénylbutyrate, etc.), se sont comportés de façon absolument identique.

Ce fait et l'exiguïté de la dose limite hémolytique de ces sels de cuivre suggèrent que la lyse qu'ils provoquent ne peut être due à leur pénétration et à leur accumulation à l'intérieur de l'hématie. Cette opinion trouve, par ailleurs, une confirmation dans les résultats obtenus au cours des essais de résistance à l'hypotonie et des mesures de volume des hématies. Etant donné que les sels de cuivre ne modifient pas plus la sensibilité des érythrocytes aux variations d'isotonie du milieu extérieur que leur volume, il paraît évident qu'ils n'interviennent pas dans la pression osmotique intracellulaire et ne provoquent pas de modi-

fication de la teneur en eau des globules rouges. Ils ne semblent donc pas influencer les échanges d'eau entre les hématies et le milieu extérieur.

Il apparaît cependant que ces sels sont capables de modifier la perméabilité des érythrocytes pour certaines substances. Nos essais d'hémolyse par l'urée et par l'éthanol montrent un abaissement de la dose limite hémolytique sous l'influence du cuivre. Une observation analogue a été faite par Wilbrandt [15] avec le glycérol. Si l'on admet, comme le laisse supposer la valeur élevée de cette dose limite, que l'hémolyse est, dans ces cas, consécutive à l'action osmotique des substances accumulées à l'intérieur de la cellule, on peut considérer les faits observés comme dénotant une pénétration plus rapide des deux substances à l'intérieur des globules soumis à l'action du cuivre.

L'abaissement de la dose limite hémolytique observé pour le glycocholate de sodium et le sulfate de quinine nous semble devoir être interprété différemment. La faiblesse des doses limites hémolytiques et nos connaissances sur le mode d'action de ces substances nous permettent d'envisager que le cuivre n'entraîne pas une augmentation de la pénétration intracellulaire, mais plutôt une action sur la surface limitante, telle que les travaux de J. Comandon [3] l'ont bien mise en évidence dans l'hémolyse par les sels biliaires. On peut penser qu'une dose hémolytique du sel de cuivre modifie suffisamment la surface limitante du globule pour permettre au glycocholate de sodium de provoquer à moindre dose l'hémolyse par action superficielle. Quant au sulfate de quinine, le fait qu'il ne possède pas les caractères de solubilité et de tensio-activité du glycocholate ne suffit pas à exclure, pour lui, la possibilité d'une intervention sur la surface cellulaire. Son pouvoir hémolytique, étudié par R. Fabre [6] du point de vue cinétique, pourrait être envisagé comme une conséquence de la combinaison de l'alcaloïde avec certains constituants protéiques de la surface de la cellule.

Peut-être l'action hémolytique des sels de cuivre peut-elle être attribuée à un mécanisme analogue ? Il est bien connu que ce métal forme aisément avec les protides des combinaisons stables [3]. Ces complexes, comme l'ont montré les travaux de Machebœuf et de ses collaborateurs [10], ne détruisent pas les cénapses, vraisemblablement abondants dans la surface limitante, et le cuivre n'y est pas combiné avec les fractions lipidiques ou phospholipidiques. Cependant, la fixation du cuivre sur les hématies, étudiée par H. Berger et M. Machebœuf [4], entraîne la formation de combinaisons différentes de celles que l'on obtient avec des protéines ou du plasma sanguin ; en particulier elles ne sont pas influencées par l'alcalinité du milieu. Faut-il supposer que le cuivre se fixe sur quelque acide aminé,

tel que le tryptophane, pour lequel il présente une particulière affinité ? Il faudrait alors admettre l'existence d'acides aminés libres à la surface limitante cellulaire, ce qui n'exclut pas les observations faites sur certaines bactéries à réaction de Gram positive, qui semblent douées d'un pouvoir de concentration considérable à l'égard de ces substances [8].

En tout cas, il semble s'agir plutôt, dans cette action, d'une fixation superficielle que d'une pénétration intracellulaire. Nos constatations relatives à la brusque chute de la charge électrique d'hématies soumises à l'action du cuivre, qui confirment les observations de R. F. Furchgott et E. Ponder [7], sont un argument de poids en faveur de cette conception. Cet abaissement de l'électrisation superficielle des érythrocytes, qui affaiblit les forces de répulsion contribuant à la dispersion des cellules en suspension, explique nos propres observations sur l'agglutination des érythrocytes sous l'influence de concentrations en cuivre non hémolytiques. Il confirme également les conceptions des auteurs [5] qui ont étudié l'agglutination des hématies par les sels de métaux lourds, mercure et bismuth, et par les traces de sels de cuivre existant dans l'eau distillée (V. Sautter et P. Lépine [14]).

Cependant, le fait que les hématies traitées par les sels de cuivre conservent une charge, affaiblie, mais négative, malgré la fixation du cation Cu^{++} fortement électro-positif, nous amène à penser, ou bien que la fixation doit être très faible et n'intéresser qu'une partie de la surface cellulaire, ou plutôt que les ions Cu^{++} ne sont pas simplement adsorbés dans la couche d'ions superficiels des particules, mais dissimulés dans des complexes non ionisés très probablement de nature protéique ; ceux-ci, lorsque la proportion de cuivre y est suffisante, provoqueraient l'hémolyse en modifiant la perméabilité cellulaire, comme semblent l'indiquer nos essais avec l'urée et l'éthanol, ou en intervenant par un processus enzymatique que peut laisser supposer le caractère peroxydasique des traces de sel de cuivre [11].

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Notre étude de l'action des sels de cuivre sur les érythrocytes de lapin a mis en évidence les faits suivants :

1° Tous les sels de cuivre essayés (sulfate, citrate, tartrate, benzoate, phénylpropionate, phénylbutyrate) provoquent l'hémolyse des hématies à partir d'une concentration de $0,013.10^{-3}$ mol. par litre.

2° De $0,001$ à $0,010.10^{-3}$ mol. par litre, les sels de cuivre provoquent l'agglutination des hématies.

3° A une dose non hémolytique ($0,0066.10^{-3}$ mol. par litre)

ils ne modifient pas le volume des hématies, ni leur résistance à l'hypotonie.

4° A cette même dose, les sels de cuivre diminuent la dose limite hémolytique du glycocholate de sodium, du sulfate de quinine, de l'urée et de l'éthanol.

5° Aux doses non hémolytiques, ils abaissent de plus de 50 p. 100 la charge électrique négative des érythrocytes.

Ces faits nous ont entraînées à formuler les conclusions suivantes :

1° L'hémolyse par les sels de cuivre est indépendante de la nature de l'anion.

2° L'action des sels de cuivre sur les hématies ne modifie pas les échanges d'eau entre les cellules et le milieu extérieur.

3° Elle ne paraît pas due à une pénétration intracellulaire des sels, mais à une fixation superficielle de l'ion Cu^{++} , consistant, non pas en une adsorption, mais peut-être en une combinaison dans des complexes cuivre-protéines.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. BERGER et M. MACHEBOEUF. *Ces Annales*, 1948, **74**, 248.
- [2] N. CHOUCROUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **196**, 777 ; 1934, **199**, 165.
- [3] J. COMANDON, DE FONBRUNE et WEIL. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 635.
- [4] H. DIACONO. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **199**, 1686 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 801 ; 1937, **125**, 828 ; *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 53.
- [5] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 571.
- [6] R. FABRE. *J. P. C.*, 1926, **4**, 385 ; *Ann. Physiol. et Phys. Chim. Biol.*, 1928, **4**, 531.
- [7] R. F. FURCHGOTT et E. PONDER. *J. Gén. Phys.*, 1941, **24**, 447.
- [8] E. F. GALE. *J. Gén. Microbiol.*, 1947, **1**, 53 et 427.
- [9] H. J. HAMBURGER. *Biochem. Zeitschr.*, 1918, **86**, 309.
- [10] MACHEBOEUF et coll. *C. R. Acad. Sci.*, 1943, **217**, 305 ; 1944, **218**, 977 ; *Ces Annales*, 1946, **72**, 631-638 ; 1947, **73**, 679-882 ; 1950, **79**, 121.
- [11] R. MOOG, A. GARRIGUE et P. VALDIGUIÉ. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**, 429.
- [12] A. QUEVAUVILLER. *Thèse Doct. ès Sci.*, Paris, 1943.
- [13] J. RÉGNIER et coll. *C. R. Soc. Biol.*, 1936 à 1946.
- [14] V. SAUTTER et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1948, **74**, 261.
- [15] WILBRANDT. *Pflügers Arch.*, 1941, **244**, 637.

LIVRES REÇUS

A. Nelson. — *Medical Botany*, 1 vol., 544 pages, 12 figures, 16 planches hors-texte. E. S. Livingstone, édit., Edimbourg, 1951. Prix : 30 Sh.

Ce volume, qui constitue la seconde partie de *Introductory Botany* du même auteur, passe en revue tous les aspects de la botanique qui peuvent intéresser le médecin, le diététicien, le pharmacien et le vétérinaire. Après quelques considérations générales sur la constitution (structure, composition, teneur en eau, etc.) des végétaux et ses rapports avec leurs qualités alimentaires, l'auteur étudie les différents minéraux qu'ils renferment et le rôle de ceux-ci, qui dépend de la nature sur lesquels ils se sont développés, avec toutes les conséquences favorables ou défavorables que cette teneur en minéraux entraîne pour les animaux élevés sur différents pâturages ; puis, les vitamines, dont les plantes sont de beaucoup la source principale. Un chapitre est consacré aux différentes manipulations, et surtout à la cuisson que doivent subir les aliments et indique les différentes méthodes de préparation qui leur conservent le mieux toutes leurs qualités nutritives, et en particulier leurs vitamines. La fabrication des conserves est également décrite, avec toutes les précautions à prendre. Ensuite, chacune des plantes susceptibles de servir à l'alimentation de l'homme est étudiée : toutes les céréales, les légumineuses destinées à être consommées sous forme de légumes secs, les différentes huiles végétales, les fruits, les légumes verts, ceux dont on consomme les racines ou les tiges, les champignons, et même les fougères et les algues qui sont utilisées de façon étendue en Extrême-Orient. Une seconde partie est consacrée aux poisons végétaux et aux plantes utilisées dans la pharmacopée ; aux boissons (bière, thé, café, cacao, etc.), aux condiments (moutarde, poivre, etc.) qui sont fabriqués à partir de certaines graines. Une dernière partie étudie les maladies causées par les plantes ou les champignons, et en particulier toutes les allergies. Enfin un dernier chapitre donne quelques indications sur l'identification macroscopique et microscopique des divers végétaux. Un index alphabétique facilite la lecture du volume.

H. T.

Frank Bamford. — *Poisons, their Isolation and Identification*. 1 vol., 3^e édit., 305 pages, 23 figures, J. et A. Churchill Ltd, London, 1951. Prix : 25 Sh.

L'auteur, qui pendant des années a été Directeur du Laboratoire de Chimie du Service médico-légal en Egypte, et qui a eu, en cette qualité, à connaître de tous les cas d'empoisonnement survenus dans ce pays pendant cette longue période, a voulu rédiger un manuel de laboratoire, destiné à tous les chimistes qui se trouvent en présence de cas d'intoxications. Il passe donc en revue, d'abord l'organisation et l'équipement des laboratoires, puis les différentes sortes de poisons : volatils, métalliques, acides et alcalins, etc., et décrit les méthodes qu'une longue expérience personnelle lui a prouvé être valables. Le chapitre concernant l'identification des alcaloïdes a été l'objet d'un soin parti-

culier. C. P. Stewart, qui a réalisé la troisième édition du livre, a mis à jour le chapitre sur les barbituriques et en a ajouté un autre sur les antihistaminiques.

H. T.

Kenneth M. Smith. — *An introduction to the study of viruses*, Sir Isaac Pitman and Sons, Ltd., London, 1950, 106 pages, prix : 10/6.

Le Professeur Kenneth Smith nous apporte un ouvrage qu'il présente lui-même comme un chapitre d'introduction à l'étude des virus. L'auteur est certainement l'un des plus qualifiés par l'importance de toute son œuvre dans le domaine des virus des plantes pour nous apporter cette vue d'ensemble.

Le plan suivi surprendra certainement ceux qui sont accoutumés à l'habituelle séparation des virus en virus des plantes, virus animaux et bactériophages, ou à ceux qui préfèrent classer les virus suivant une échelle ascendante ou descendante de taille ou encore selon leurs propriétés. L'auteur a préféré étudier d'abord le mode de transmission et de dispersion des virus, puis les relations existant entre les virus et leurs éventuels arthropodes vecteurs avant d'aborder l'étude des maladies à virus les plus représentatives des affections étudiées, dont il étudie ensuite les propriétés physiques et chimiques. Les derniers chapitres sont plus proprement techniques car ils envisagent successivement la microscopie électronique, la sérologie et enfin la lutte contre les maladies à virus.

Le livre abonde en idées originales et en rapprochements intéressants. Tous ceux qui participent à l'étude théorique des virus auront à cœur de le lire. Mais on ne peut s'empêcher, étant donné le plan suivi, d'y trouver souvent des énumérations de caractères ou de propriétés qui rapprochent parfois artificiellement des espèces aussi hétérogènes que le sont par exemple les virus animaux comparés aux virus des plantes. Il en résulte inévitablement un certain décousu et souvent, dans le corps même d'un chapitre, une inégalité de relief entre les sujets traités. A côté de données du plus haut intérêt sur la transmissibilité des virus des plantes, on trouve des faits élémentaires sur le bactériophage, depuis longtemps dépassés. Une étude détaillée des insectes est présentée sur un plan beaucoup plus élevé que les notions très sommaires sur la séro-protection dans les maladies à virus. L'auteur a eu en vue d'intéresser au sujet ceux qui étudient les frontières communes à plusieurs disciplines : il a, dans l'ensemble, atteint son but, sans toujours tenir la balance égale entre les résultats les plus récents des recherches actuelles et des notions classiques par trop élémentaires.

P. L.

ERRATUM

Ces *Annales*, 81, août, p. 126, mémoire de F. van Deinse, titre : *Au lieu de : « Considérations sur la valeur de la vaccination antituberculeuse par le BCG », lire : Considérations sur la valeur de la vaccination antituberculeuse par le BCG. »*

Le Gérant : G. MASSON.